



# 神奈川県衛生研究所研究報告

第50号（令和2年10月）

## 目 次

### 短報

#### 感染症の監視と予防に関する調査研究

感染性胃腸炎患者からの原因菌の検出及び下痢原性大腸菌における病原因子の保有状況

政岡智佳, 古川一郎, 伊達佳美, 陳内理生, 播磨由利子, 鈴木美雪,  
中嶋直樹, 大屋日登美 ..... 1

#### 食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

健康危機管理に係る食品中に含まれる農薬の迅速試験法—GC-MS/MS及びLC-MS/MSを用いた検討—

福光徹, 脇ますみ, 萩尾真人, 林孝子, 桑原千雅子 ..... 5

pH標準液の安定性の検討

外館史祥, 甲斐茂美, 岩橋孝祐, 羽田千香子, 熊坂謙一 ..... 11

ヘリウムガス不足に対応した繊維製品中防虫加工剤の分析法

西以和貴, 上村仁, 河上強志 ..... 15

### 資料

#### 感染症の監視と予防に関する調査研究

神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（令和元年度）

古川一郎, 政岡智佳, 中嶋直樹 ..... 21

神奈川県域におけるインフルエンザウイルスの検出状況（2019/2020シーズン）

渡邊寿美, 近藤真規子, 佐野貴子, 稲田貴嗣, 櫻木淳一 ..... 25

#### 食品と医薬品の安全・安心に関する調査研究

食品中の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類分析法の検討及び適用試験結果

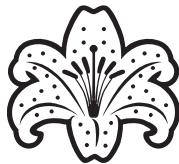
酒井康宏, 西みゆき, 粟野由梨佳, 上原基浩, 佐藤久美子,  
脇ますみ, 相川勝弘 ..... 28

### 緊急寄稿

トピックを通じて知る新型コロナウイルス

櫻木淳一 ..... 31

他誌掲載論文抄録（令和元年4月～令和2年3月） ..... 37



県の花：山ゆり

神奈川県衛生研究所（令和2年度）

高崎智彦	山下穂大
白井政美	寺西大
橋本正彦	関戸晴子
櫻木淳一	上村仁
相川勝弘	

神奈川県衛生研究所研究報告編集員（令和2年度）

橋本正彦（編集長）	福田武二郎
伊藤舞	中嶋直樹
佐野貴子	甲斐茂美
芳賀勇太	殿原真生子
渡邊裕子（事務局）	

神奈川県衛生研究所研究報告第50号

令和2年10月発行

編集 神奈川県衛生研究所  
発行 〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1  
TEL 0467-83-4400  
印刷 株式会社 シーケン  
〒244-0842 横浜市栄区飯島町1439  
TEL 045-893-5171(代)

## 短報

# 感染性胃腸炎患者からの原因菌の検出 及び下痢原性大腸菌における病原因子 の保有状況

政岡智佳, 古川一郎, 伊達佳美, 陳内理生,  
播磨由利子\*, 鈴木美雪, 中嶋直樹, 大屋日登美

## Isolation of diarrheal pathogen from patients with diarrhea and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli*

Tomoka MASAOKA, Ichiro FURUKAWA,  
Yoshimi DATE, Michio JINNAI,  
Yuriko HARIMA\*, Miyuki SUZUKI,  
Naoki NAKAJIMA and Hitomi OHYA

感染性胃腸炎は、細菌またはウイルスなどの感染性病原体による感染症であり、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）に基づく5類感染症小児科定点報告の対象となっている。臨床症状としては、原因となる病原体や宿主の状態により異なるが、発熱、下痢、恶心、嘔吐、腹痛などが見られる。

感染性胃腸炎の原因となる細菌は複数存在するが、下痢原性大腸菌はその中で代表的な細菌である。下痢原性大腸菌には、腸管病原性大腸菌(*enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC), 腸管毒素原性大腸菌(*enterotoxigenic E. coli*, ETEC), 腸管侵入性大腸菌(*enteroinvasive E. coli*, EIEC), 腸管出血性大腸菌(*enterohemorrhagic E. coli*, EHEC)などがある。2012年に感染症サーベイランスシステムの病原体検出情報システムで下痢原性大腸菌の分類の見直しが行われ、これまでO血清型で判断されていたEPECが`eae`の保有の有無に変更され、さらに`aggR`を保有する大腸菌が腸管凝集付着性大腸菌(*enteroaggregative E. coli*, EAggEC)として新たに追加されるなど、血清型別を中心分類されていたものが、病原因子関連遺伝子の保有の有無による分類へと変更された<sup>1)</sup>（表1）。

そこで本研究では、神奈川県における感染性胃腸炎の原

表1 下痢原性大腸菌の分類

分類	略称	主な病原因子等	定義
腸管出血性大腸菌	EHEC	VT1、VT2	Vero毒素(VT)産生性あるいはVT遺伝子が確認されたもの
腸管毒素原性大腸菌	ETEC	LT、ST	易熱性エンテロトキシン(LT)、耐熱性エンテロトキシン(ST)、あるいはその両者の産生性あるいは毒素遺伝子が確認されたもの
腸管侵入性大腸菌	EIEC	<i>invE</i>	組織侵入性プラスミドを保有していること、あるいは組織侵入性遺伝子が確認されたもの
腸管病原性大腸菌	EPEC	<i>eae</i>	培養細胞への局在付着性、または、それに関連する遺伝子が確認されたもの VT、LT、ST、侵入性が確認されたものを除く
腸管凝集付着性大腸菌	EAggEC	<i>aggR</i>	培養細胞への凝集付着性、または、それに関連する遺伝子が確認されたもの VT、LT、ST、侵入性が確認されたものを除く
他の下痢原性大腸菌		<i>afaD</i> 、 <i>astA</i>	上記5つに該当しないが胃腸炎の原因菌と考えられるもの 生化学的性状が同じものが多数の患者より検出された場合

神奈川県衛生研究所 微生物部  
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

\* 相模原市衛生研究所  
〒252-0236 相模原市中央区富士見1-3-41

表2 プライマーの塩基配列と増幅サイズ

標的遺伝子	プライマー	Sequence(5'-3')	増幅サイズ(bp)
<i>invE</i>	I-1	ATA TCT CTA TTT CCA ATC GCG T	379
	I-51	GCG GAG AAA TTA TAT CCC G	
<i>stx1</i>	mmk1_1	GAA TTT ACC TTA GAC TTC TCG AC	234
	mmk1_2	TGT CAC ATA TAA ATT ATT TCG TTC	
<i>stx2</i>	mmk2_1	GAG TTT ACG ATA GAC TTT TCG AC	234
	mmk2_2	GCG CAC ATA TAA ATT ATT TTG CTC	
<i>STp</i>	ST1a_as	GGA TTA CAA CAA AGT TCA CAG	179
	ST1a_s	GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TT	
<i>STh</i>	ST1b_S2	TTT TTC ACC TTT CGC TCA G	179
	ST1b_A1	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AG	
<i>LT</i>	LT-11	CCC ACC GGA TCA CCA	123
	LT-2	GTG CTC AGA TTC TGG GTC TC	
<i>eae</i>	mSK1	CCG GCA CAA GCA TAA GC	310
	eaekas_a	TGG CAA AAT GAT CTG CTG	
<i>aggR</i>	aggR_multi_S4	GCG ATA CAT TAA GAC GCC TA	254
	aggR_multi_A4	AAA GAA GCT TAC AGC CGA TA	
<i>astA</i>	EASTOS1	GCC ATC AAC ACA GTA TAT CCG	109
	EASTOAS2	CGC GAG TGA CGG CTT TGT AG	
<i>afaD</i>	afaDks1	GGG AGT ATA AGG AAG ATG ATG C	207
	adaDks1	GTC CAC CTG ACG CTC A	

表3 年度別の病原菌検出状況

年度	検体数	病原菌検出		検出病原菌(検体)			
		検体数 (検出率%)	下痢原性 大腸菌	カンピロバクター・ ジェジュニ/コリ	サルモネラ 属菌	エロモナス 属菌	ウェルシュ菌
2014	102	31 (30.4%)	24	7			
2015	89	26 (29.2%)	25	2	1	1	
2016	41	12 (29.3%)	10	3		1	
2017	18	7 (38.9%)	5	2		1	
2018	29	5 (17.2%)	3	1		2	
計	279	81 (29.0%)	67	15	1	3	2

※病原菌の重複感染の検体は7検体

因菌の検出状況を調査するとともに、下痢原性大腸菌の病原因子の保有状況について調査を行ったので報告する。

#### 材料および方法

2014年4月から2019年3月の間に、協力医療機関から搬入された感染性胃腸炎患者便279検体を調査対象とした。

患者便は保存培地入りの採便管を使用し当所に搬入された。検出対象菌は、下痢原性大腸菌、腸炎ビブリオ、コレラ菌、ナグビブリオ、ビブリオ・フルビアリス、赤痢菌、サルモネラ属菌、チフス菌、パラチフス菌、黄色ブドウ球菌、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ、ウェルシュ菌、セレウス菌、エロモナス属菌、エルシニア・エンテロコリチカ及びプレジオモナス・シゲロイデスとし常法に従い分離及び同定を行った。大腸菌の病原因子の検出にはPCR法を用い、検出を行った病原因子及び使用したプライマーは表2に示した。病原因子が検出されるか、検出されない場合でも市販のO血清で凝集

搬入数と検出率(平均)

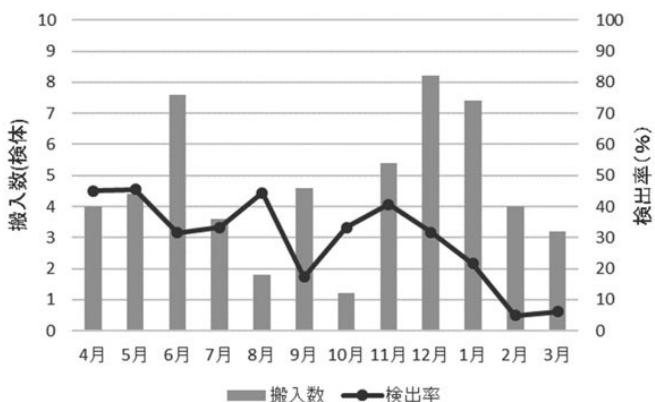


図1 月別の検体搬入数と感染性胃腸炎原因菌検出率

が確認されたものを下痢原性大腸菌とした。

#### 結果および考察

279検体中81検体（29.0%）から88株の感染性胃腸炎原因菌が分離され、このうち複数の菌種が感染していたのは7検体であった。各年度の感染性胃腸炎原因菌の検出率は2018年度が一番低く17.2%で2017年度が一番高く38.9%となり、調査期間中の平均は29.0%であった（表3）。菌種別の検出状況は、いずれの年度でも下痢原性大腸菌が最も多く、次いでカンピロバクター・ジェジュニ/コリという結果となった（表3）。この2つは調査期間中、毎年度検出されており、感染性胃腸炎原因菌として市中に常在している可能性が示唆された。

月別の感染性胃腸炎原因菌の検出率を図1に示した。検体搬入数は11月から1月にかけて増加しているが、感染性胃腸炎原因菌の検出率は4月から8月にかけて高くなっている。冬場の感染性胃腸炎検体数の増加はウイルス性下痢症など、細菌以外が原因となっている可能性が考えられた。

下痢原性大腸菌は67検体から68株分離され、検出を行った病原因子のいずれかを保有していたのは29株であった（表4）。最も多く検出された病原因子はastAで他の病原因子との重複保有も含めて13株検出され、調査期間中は毎年度検出された。astA保有大腸菌の検出数が多いのは、他の自治体の報告と同様であった<sup>2)</sup>。複数の病原因子が検出された2株は、ST（耐熱性エンテロトキシン、heat-stable enterotoxin）遺伝子とastA及びaggRとastAという組み合わせであった。astAは腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素をコードする遺伝子で、本調査と同様にEPECやEAggECといった下痢原性大腸菌から検出されたという報告もあり<sup>3)</sup>、様々な下痢原性大腸菌が保有していると考えられた。astA

表4 下痢原性大腸菌の病原遺伝子保有状況

年度	病原遺伝子		検出病原遺伝子(株)					
	不検出株数	検出株数	<i>astA</i>	<i>afaD</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aggR+astA</i>	<i>ST+astA</i>
2014	18	6	3	3				
2015	15	10	4	4	1	1		
2016	3	7	3	3		1		
2017	3	3			1		1 <sup>1)</sup>	1 <sup>1)</sup>
2018		3	1	1	1			
計	39 <sup>2)</sup>	29	11 <sup>3)</sup>	11 <sup>4)</sup>	3 <sup>5)</sup>	2 <sup>6)</sup>	1 <sup>7)</sup>	1 <sup>8)</sup>

※重複感染検体を含む

1)同一患者由来の菌株

2)O1:5株, O6:3株, O8:2株, O18:5株, O25:7株, O27:1株, O44:2株, O55:1株, O86a:2株, O111:1株, O124:1株, O125:2株, O146:2株, O152:1株, O153:2株, O166:1株, O167:1株

3)O1:1株, O6:2株, O25:1株, O型別不能:7株

4)O1:2株, O15:1株, O18:1株, O25:3株, O型別不能:4株

5)O型別不能:3株

6)O型別不能:2株

7)O型別不能:1株

8)O169:1株

表5 下痢原性大腸菌の病原遺伝子検出状況と主な臨床症状

病原遺伝子	患者数	症状		
		下痢	嘔吐	発熱
<i>aggR</i> 単独	2	2 (100%)	2 (100%)	
<i>eae</i> 単独	2	2 (100%)	1 (50%)	
<i>astA</i> 単独	10	8 (80%)	2 (20%)	1 (10%)
<i>afaD</i> 単独	9	8 (88.9%)	3 (33.3%)	
[ST+astA]+[aggR+astA]	1	1 (100%)		
病原遺伝子不検出	36	33 (91.7%)	7 (19.4%)	8 (22.2%)
下痢原性大腸菌単独				

( )内の数値は、各下痢原性大腸菌に感染した患者のなかで症状を呈した患者の割合を示す。下痢原性大腸菌が検出された患者の中に無症状者はいなかった。

患者の中には複数の臨床症状を呈するものがいた。

単独での下痢原性は不明であるが、*astA* 単独保有大腸菌による食中毒が報告されており<sup>4)</sup>、*astA* 単独保有の大腸菌でもヒトに下痢などを引き起こす可能性があると考えられる。東京都が行った食品由来大腸菌の病原遺伝子保有状況の調査では、供試した大腸菌株277株のうち38株（13.7%）が*astA*を保有しており、検出された病原遺伝子の中で最も多く、*astA* 保有大腸菌の92%は生

野菜から分離された株であった<sup>5)</sup>。これらのことから、*astA*は他の地域同様に神奈川県でも検出頻度の高い病原遺伝子であり、身近な下痢原性大腸菌の病原因子のひとつとして注意が必要であると考えられた。

下痢原性大腸菌の病原遺伝子検出状況と主な臨床症状について表5にまとめた。*aggR*は凝集線毛の産生を促進的に制御する遺伝子で、小児の持続性下痢との関連性が示唆されている<sup>6)</sup>。東京都や鹿児島県の報告では*eae* 検出のEPECと比較し、*aggR* 検出のEAggECに感染した患者で嘔吐の症状が多く見られており<sup>2)7)</sup>、本調査でも*aggR* 検出大腸菌単独感染の患者の2人中2人で嘔吐が見られた。また、鹿児島県の報告では*eae*が検出されたEPEC単独感染の患者のうち83.3%で発熱が見られ、他の分類の下痢原性大腸菌患者と比較し高い割合であった<sup>2)</sup>。本調査では*eae* 検出大腸菌の単独感染の患者の2人中1人で発熱の症状が見られ、発熱の症状が見られた他の分類の下痢原性大腸菌と比較すると高い割合であった。*eae*は付着因子であるインチミンをコードする遺伝子で、多くのEHEC菌株が保有していることが知られているが、発熱との関連は不明であった。

今回の調査で下痢原性大腸菌は感染性胃腸炎の原因菌として最も身近なものであり、様々な病原因子を保有していることが明らかとなった。検出された病原因子の中

には、患者の臨床症状と関連が疑われる症例もあったが、関連性を明らかにすることはできなかった。下痢原性大腸菌の病原因子の保有状況と患者の臨床症状の関連を調査することは、各病原因子の病原性を明らかにすることに繋がると考えられ、今後も調査を継続し、データを蓄積していくことが重要であると考えられた。

#### 謝辞

本調査の遂行にあたりご協力いただいた医療機関の皆さんに深謝いたします。

#### 参考文献

- 1) 伊藤健一郎, 伊豫田淳, 八柳潤, 甲斐明美, 磯部順子, 勢戸和子ほか : 下痢原性大腸菌の分類の見直しについて, IASR, 33(1), (2012)
- 2) 濱田まどか, 石谷完二, 濱田結花, 上村晃秀, 御供田睦代 and 岩切忠文 : 感染症発生動向調査事業における下痢原性大腸菌の検出状況, 鹿児島県環境保健センター所報, 14, 59-62, (2013)
- 3) 磯崎将博, 小林治, 星子文香, 津嶋かおり, 金子優, 松下久美子ほか : 下痢症患者から分離された下痢原性大腸菌の各種病原因子の保有状況について, 日本臨床微生物学雑誌, 26(1), (2016)
- 4) 中村寛海, 梅田薰, 山本香織, 長谷篤, 平井有紀, 小笠原準ほか : 腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子(*astA*)保有大腸菌O166:H15が原因と考えられた社員食堂における食中毒事例について一大阪市, IASR, 36, 89-90, (2015)
- 5) 上原さとみ, 松下秀, 鈴木康規, 小林真紀子, 加藤玲, 村内このみほか : 食品由来大腸菌の下痢原性に関与する病原遺伝子の保有状況と薬剤耐性, Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health, 67, 121-126, (2016)
- 6) Guodong D. Fanf, Aldo A. M Lima, Ceci V. Martins, James P. Nataro and Richars L. Guerrant : Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study, Journal of Pediatrc Gastroenterology and Nutrition, Aug; 21(2), 137-44, (1995)
- 7) 加藤玲, 尾形和恵and 山田澄夫 : 散発下痢症患者由来大腸菌の腸管病原性大腸菌(EPEC)*eaeA*遺伝子および腸管凝集性大腸菌(EAggEC)*aggR*遺伝子保有状況とその病原性の評価, 感染症誌, 76, 721-729, (2002)

## 短報

# 健康危機管理に係る食品中に含まれる農薬の迅速試験法 —GC-MS/MS及びLC-MS/MSを用いた検討—

福光徹, 脇ますみ\*, 萩尾真人,  
林孝子, 桑原千雅子

## Fast method for detection of pesticides in foods related to health crisis management using GC-MS/MS and LC-MS/MS

Toru FUKUMITSU, Masumi WAKI\*,  
Masahito HAGIO, Takako HAYASHI  
and Chikako KUWAHARA

### 緒言

当所では、食品への農薬混入が疑われる事例や、野鳥等動物のへい死事例が発生した際には、必要に応じて農薬検査を実施し、原因究明及び健康被害の発生・拡大防止に努めている。このような健康危機事例に効率的に対応するためには、多様な検査対象品に適用できる迅速な試験法の整備が必要であることから、平成25年3月26日付け事務連絡<sup>1)</sup>を参考とし、有機リン系農薬を対象として、GC-MSによる食品中に含まれる農薬の迅速試験法をこれまでに構築した（以下、既報<sup>2)</sup>）。今回、より広範囲の健康危機事例への対応を可能とするため、既報を改良し、対象農薬を追加して、GC-MS/MS及びLC-MS/MSを用いた試験法を新たに構築し、性能評価を実施したので報告する。

### 方法

#### 1. 試料

加工食品として冷凍えびドリア、冷凍餃子、冷凍あじ竜田揚げ、白菜キムチ、レトルトカレー及び赤ワインを用いた。また、野鳥のへい死事例を想定した試料として、

神奈川県衛生研究所 理化学部  
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1  
\*現 地域調査部

未加工の鶏砂肝を用いた。

#### 2. 試薬

対象農薬は、有機リン系66農薬、N-メチルカーバメート系17農薬及びその他の系統の7農薬（合計90農薬）とした（表1及び表2）。これらの農薬の標準物質は、富士フィルム和光純薬株、林純薬工業株、Dr.Ehrenstorfer社又はMerck社（Sigma-Aldrich）製の残留農薬試験用又はその同等品を用いた。標準物質はそれぞれアセトンに溶解し、1,000 mg/Lの標準原液を調製した。各標準原液を混合し、アセトンを用いて各2 mg/Lの混合標準溶液を調製した。

アセトン、アセトニトリル、酢酸エチル及びn-ヘキサンは富士フィルム和光純薬株製の残留農薬・PCB試験用（濃縮300）、無水硫酸ナトリウムは同社製の残留農薬・PCB試験用、メタノールは同社製のLC/MS用、酢酸アンモニウムはMerck社製のLC/MS用を用いた。水は、Merck社製Milli-Q Integral 5で精製した超純水を使用した。吸引ろ過の際のろ過助剤は富士フィルム和光純薬株製のセライトNo.545、ろ紙は東洋漉紙株製のNo.5A（φ55 mm）を用いた。分散固相は、ジーエルサイエンス株製のInertSep PSAを用いた。

EU Reference Laboratoriesで推奨されているアナライトプロテクタント（以下、AP）<sup>3, 4)</sup>の調製には、Merck社（Sigma-Aldrich）製の3-エトキシ-1,2-プロパンジオール、東京化成工業株製のD-(+)-グルコノ-1,5-ラクトン、同社製のD-ソルビトール及びCombi-Blocks社製のシキミ酸を用いた。AP混合液は、上記の4試薬がそれぞれ200 mg/mL、10 mg/mL、5 mg/mL及び5 mg/mLとなるように、アセトニトリル-水（6:4）混液を用いて調製した<sup>3, 4)</sup>。

#### 3. 装置及び測定条件

##### 3. 1 装置

GC-MS/MS : GCはAgilent Technologies社製7890B、MS/MSは同社製7000Dを用いた。

LC-MS/MS : LCは島津製作所製Prominenceシリーズ、MS/MSはSCIEX社製3200 Q TRAPを用いた。

ホモジナイザーは日本精機株製バイオミキサーBM-2、振とう機はタイトック株製SR-2s、遠心分離機は株トミー精工製GRX-220及び久保田商事株製6200を用いた。

##### 3. 2 測定条件

GC-MS/MS及びLC-MS/MS測定条件をそれぞれ表3及び表4に、各対象農薬の測定イオンを表1及び表2に示した。測定機器は、ライブライアリを活用することにより多くの農薬を推定できる可能性のあるGC-MS/MSの使用を基本とし（表1）、GCでの測定が困難なN-メチルカーバメート系6農薬及びその他の系統の1農薬のみ、LC-

MS/MSを使用した（表2）。

#### 4. 試験溶液の調製

既報を改良した、GC-MS/MS及びLC-MS/MS測定用試験溶液の調製方法を図1に示した。本法により、性能評価を実施した。

#### 5. 検量線（絶対検量線法）

各対象農薬の2 mg/L混合標準溶液を3%AP混合液含有・アセトン-n-ヘキサン（5:3）混液で希釈して0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06及び0.08 mg/L溶液を調製し、GC-MS/MS測定における検量線用混合標準溶液とした。また、上記の2 mg/L混合標準溶液をメタノールで希釈して0.01, 0.015, 0.02, 0.025, 0.03及び0.04 mg/L溶液を調製し、LC-MS/MS測定における検量線用混合標準溶液とした。検量線は、上記濃度のうち4点以上を用いたピーク面積法による直線検量線 ( $r^2 \geq 0.99$ )とした。

#### 6. 性能評価

事務連絡<sup>1)</sup>に基づき、性能評価を行った。各対象農薬が0.1 mg/kgとなるように2 mg/L混合標準溶液をブランク試料10.0 gに添加して30分間放置し、添加回収試験を実施した。試験は3併行で実施し、表5に示す4種類の性能パラメータの目標値への適合を確認した。

### 結果及び考察

#### 1. 対象農薬の選択

既報で対象とした有機リン系66農薬に加え、過去の検出事例及び急性毒性の強さを考慮し、N-メチルカーバメート系17農薬を選択した。また、家庭用殺虫剤や園芸用農薬等に用いられ、入手が容易な農薬として、その他の系統の7農薬を選択した。

#### 2. 試験法の検討

##### 2. 1 GC-MS/MSによる試験法

既報では、GC-MSを用いた選択イオンモニタリング(SIM)による測定を行い、対象の有機リン系農薬のうち、90%以上の農薬が性能評価に適合した。しかし、SIM測定のため、クロマトグラムに試料由来と考えられる妨害ピークやノイズが多く、目的ピークの分離が不十分な農薬や、選択性の評価が不適合となる農薬があった。また、性能評価に不適合となった農薬の多くは、回収率が200%を超えていたことから、試料由来成分、すなわちマトリックスの影響を強く受けていると考えられた。

そこで、妨害ピークやノイズの影響を抑制するため、GC-MS/MSを用いた選択反応モニタリング(SRM)による測定を行った。また、GC-MS/MSは、JetCleanセルフクリーニングイオン源を搭載した機種を用いた。これは、微量の水素ガスを流してイオン源の汚染を最小限に抑制する機能であり、イオン源のメンテナンス頻度を低

減させるだけでなく、測定におけるマトリックスの影響を抑制する効果も認められている<sup>5)</sup>。

さらに、試験溶液の調製方法についても、既報から若干変更した。主な変更点を次に示した。まず、操作の簡便化を目的とし、酢酸エチル抽出液の減圧濃縮を省略し、分散固相を加えて振とうする時間を10分間から3分間に短縮した。また、マトリックスの影響の抑制を目的とし、酢酸エチル抽出液の分取量を試料0.5 g相当（10 mLにメスアップして0.5 mLを分取）から0.4 g相当（100 mLにメスアップして4 mLを分取）に減少させた。

以上のように変更した測定方法及び試験溶液調製方法（以下、変更法）を用いて、有機リン系66農薬を対象とし、冷凍餃子を試料として検討したところ、既報ではアジンホスメチル、アニロホス及びバミドチオൺの3農薬の回収率が200%を超えたのに対し、変更法では全ての有機リン系対象農薬の回収率が目標値を満たして200%未満となり、マトリックスの影響を抑制することができた。また、ピーク分離及び選択性も向上し、全ての有機リン系対象農薬において選択性の評価が適合となった。

変更法について、N-メチルカーバメート系及びその他の系統の24農薬のうち、GC-MS/MS測定対象とした17農薬を追加し、合計83農薬に対して冷凍餃子を試料として検討したところ、レスメトリーンの回収率が50%未満となつたが、他の追加農薬の回収率は目標値を満たした。一方、鶏砂肝を試料とした場合、回収率が50%未満の農薬はなかつたが、アセフェート、オメトエート、バミドチオൺ、ホスチアゼート、ホスマミドン、カルボフラン及びメチオカルブの7農薬の回収率が200%を超えた。そこで、さらなるマトリックスの影響の抑制を目的とし、試験溶液へのAPの添加を検討した<sup>3, 4)</sup>。試験溶液及び検量線用混合標準溶液の溶媒を、アセトン-n-ヘキサン（1:1）混液から3%AP混合液含有・アセトン-n-ヘキサン（5:3）混液<sup>3, 4, 6)</sup>に変更し、鶏砂肝を試料として全ての対象農薬についてAPの効果を検討したところ、いずれも回収率が目標値を満たして200%未満となり、マトリックスの影響をさらに抑制することができた。

##### 2. 2 LC-MS/MSによる試験法

試験溶液の調製方法は、GC-MS/MSによる試験法と可能な限り同様とし、試験溶液の溶媒のみをメタノールに変更した。分析カラムは、測定の迅速性を考慮し、一般的に使用される全多孔性カラムに比べて高速分析が可能なコアシェルカラムを用いることとした。この試験法を用いて、LC-MS/MS測定対象とした7農薬に対し、冷凍餃子を試料として検討したところ、チオジカルブの回収率が50%未満となつたが、他の農薬の回収率は目標値を満たした。

表1 GC-MS/MS測定対象農薬、測定イオン及び性能評価結果

農薬	分類*	測定イオン ( <i>m/z</i> )		RT (分)	回収率 (%)						
		定量	確認		冷凍えび ドリア	冷凍餃子	白菜 キムチ	冷凍あじ 竜田揚げ	レトルト カレー	赤ワイン	鶏砂肝
1 EPN	OP	169 > 77	157 > 110	18.8	92.3	100.4	102.5	93.6	91.4	98.4	95.0
2 アジンホスエチル	OP	160 > 132	160 > 77	20.1	93.8	105.7	102.9	108.7	97.4	99.7	97.0
3 アジンホスマチル	OP	160 > 132	160 > 77	19.6	103.7	105.7	98.4	111.3	95.7	97.1	120.4
4 アセフェート	OP	136 > 42	136 > 94	8.7	54.0	58.6	71.1	68.7	54.6	104.6	73.7
5 アニロホス	OP	226 > 184	226 > 157	19.1	95.8	104.7	109.4	122.1	96.2	100.7	112.3
6 イサゾホス	OP	257 > 162	257 > 119	12.8	87.3	94.3	95.1	96.5	86.8	87.3	86.9
7 イソキサチオン	OP	177 > 130	313 > 130	16.7	97.4	176.8	111.9	125.1	89.8	98.6	110.0
8 イソフェンホス	OP	213 > 121	213 > 185	15.2	87.2	95.2	94.3	101.2	89.9	95.6	84.1
9 イプロベンホス	OP	204 > 91	204 > 122	13.1	85.3	93.9	94.9	98.0	86.0	93.8	84.0
10 エチオノ	OP	231 > 129	231 > 175	17.2	85.0	94.5	94.8	97.9	87.1	93.5	85.3
11 エディフェンホス	OP	310 > 173	310 > 109	17.8	96.9	104.7	105.9	114.8	91.4	98.0	119.3
12 エトプロホス	OP	158 > 97	158 > 114	10.9	76.4	87.1	88.5	92.1	76.4	81.2	76.4
13 エトリムホス	OP	292 > 181	292 > 153	12.9	80.4	87.9	86.1	92.9	86.3	82.3	78.1
14 オメトエート	OP	156 > 110	156 > 79	10.5	86.6	87.4	92.7	86.4	81.7	97.3	96.5
15 カズサホス	OP	159 > 97	158 > 114	11.5	71.1	73.9	74.2	77.9	69.4	69.1	67.5
16 キナルホス	OP	146 > 118	146 > 91	15.4	85.7	95.4	94.2	97.9	86.9	93.3	83.2
17 クロルピリホス	OP	314 > 258	314 > 286	14.4	77.5	84.8	85.0	83.2	78.0	77.1	76.5
18 クロルピリホスマチル	OP	286 > 93	286 > 271	13.5	80.8	89.1	86.8	92.0	81.1	78.7	78.8
19-1 クロルフェンビンホス (E)	OP	267 > 159	323 > 267	15.1	92.0	102.0	92.7	100.8	93.7	101.0	89.6
19-2 クロルフェンビンホス (Z)	OP	267 > 159	323 > 267	15.3	90.6	98.7	97.2	104.8	90.3	97.6	87.3
20 サリチオン	OP	216 > 137	216 > 183	11.4	86.8	93.8	89.8	99.6	85.8	79.6	83.0
21 シアノフェンホス	OP	303 > 141	303 > 169	17.7	91.1	101.1	100.3	105.8	92.8	98.2	94.0
22 シアノホス	OP	243 > 109	243 > 116	12.5	89.7	97.1	94.6	103.7	88.0	92.1	84.4
23 ジクロフェンチオン	OP	279 > 223	279 > 205	13.4	74.0	82.9	82.0	83.6	78.0	72.6	71.8
24 ジクロルボス	OP	185 > 93	220 > 185	6.7	53.0	80.6	80.8	81.5	79.7	59.2	66.5
25 ジスルホトン	OP	186 > 97	274 > 88	12.8	89.0	132.3	122.2	137.7	141.2	169.9	183.2
26 ジメチルビンホス (Z)	OP	295 > 109	295 > 79	14.5	91.7	99.3	98.7	105.6	88.7	95.5	96.4
27 ジメトエート	OP	125 > 47	125 > 79	12.0	99.0	118.1	115.8	117.2	103.6	104.7	102.6
28 スルプロホス	OP	322 > 156	322 > 139	17.5	84.2	99.5	100.6	99.8	90.4	108.0	104.4
29 ダイアジノン	OP	199 > 93	304 > 179	12.5	76.0	84.9	82.0	80.2	73.0	72.9	67.5
30 テトラクロルビンホス	OP	329 > 109	329 > 79	15.8	94.1	102.4	100.2	108.7	93.9	96.9	109.6
31 テルブホス	OP	231 > 129	231 > 175	12.4	75.2	86.5	83.0	85.4	86.8	78.7	85.8
32 トリアゾホス	OP	257 > 162	285 > 162	17.5	91.9	101.1	101.7	112.7	88.1	101.6	103.8
33 トリブホス	OP	202 > 113	169 > 113	16.4	57.5	64.3	60.5	65.4	63.2	64.5	60.4
34 トルクロホスマチル	OP	265 > 250	265 > 93	13.7	84.1	92.9	89.4	89.5	84.4	79.2	81.6
35 バミドチオン	OP	145 > 87	145 > 112	15.9	107.5	122.6	121.6	128.0	121.1	140.3	182.1
36 パラチオン	OP	291 > 109	291 > 81	14.6	88.8	93.6	102.1	97.9	92.0	99.0	88.2
37 パラチオニメチル	OP	263 > 109	263 > 246	13.7	94.7	98.5	96.7	94.7	92.7	94.5	92.4
38 ピペロホス	OP	140 > 98	320 > 122	18.8	89.4	96.9	103.6	102.4	93.0	93.3	90.6
39 ピラクロホス	OP	194 > 138	360 > 97	20.2	85.5	107.9	106.3	116.6	98.6	100.2	112.2
40 ピラゾホス	OP	221 > 193	232 > 204	19.9	91.0	101.0	104.2	109.9	96.1	100.5	105.3
41 ピリダフェンチオン	OP	340 > 199	340 > 109	18.6	92.8	107.8	110.2	97.2	100.2	103.5	104.6
42 ピリミホスマチル	OP	290 > 125	305 > 180	14.0	82.0	89.2	88.2	93.0	84.9	85.7	79.6
43 フェナミホス	OP	303 > 195	303 > 288	16.1	105.5	124.3	125.5	130.1	124.4	135.0	163.4
44 フェニトロチオン	OP	277 > 260	277 > 109	14.2	93.9	102.1	95.6	103.0	94.4	93.4	89.9
45 フエンスルホチオン	OP	293 > 97	293 > 125	17.1	92.7	102.8	104.9	111.0	89.4	107.7	98.3
46 フェンチオン	OP	278 > 109	278 > 169	14.5	89.3	102.6	100.0	102.1	98.2	106.0	100.7
47 フェントエート	OP	274 > 121	274 > 93	15.4	91.1	100.1	98.3	97.8	90.8	94.4	87.7
48 プタミホス	OP	286 > 202	286 > 185	16.0	93.1	102.1	99.8	95.8	90.1	100.5	90.4
49 プロチオホス	OP	267 > 239	309 > 239	16.2	62.0	70.5	71.4	74.3	67.6	68.7	70.5
50 プロパホス	OP	304 > 220	304 > 140	15.7	90.8	105.0	110.4	107.7	106.2	116.4	107.6
51 プロフェノホス	OP	339 > 269	339 > 311	16.3	83.8	86.8	92.2	102.6	84.4	95.6	100.3
52 プロモホス	OP	331 > 316	331 > 93	14.9	75.9	86.1	87.2	87.3	79.8	78.2	76.6
53 プロモホスマチル	OP	359 > 303	359 > 331	15.7	66.3	72.5	77.6	77.0	67.8	69.0	64.4
54 ホサロン	OP	182 > 111	367 > 182	19.4	96.2	100.6	104.0	112.1	98.0	98.9	109.0
55 ホスチアゼート I, II	OP	195 > 103	195 > 60	14.9	96.3	99.3	103.6	108.1	95.1	101.1	99.7
56-1 ホスファミド I	OP	264 > 127	264 > 193	12.6	98.2	97.6	100.6	98.1	95.0	95.8	100.6
56-2 ホスファミド II	OP	264 > 127	264 > 193	13.3	88.9	90.7	106.1	89.0	93.4	98.3	90.4
57 ホスマット	OP	160 > 77	160 > 133	18.8	90.6	97.4	100.1	106.7	88.9	96.7	96.3
58 ホルモチオン	OP	170 > 93	198 > 93	13.2	68.6	69.0	69.0	80.6	71.2	86.0	69.8
59 ホレート	OP	231 > 175	260 > 75	11.6	78.6	97.3	90.0	106.5	82.1	77.6	98.4
60 マラチオン	OP	173 > 99	173 > 127	14.3	92.2	99.4	93.6	100.5	90.4	100.6	79.1
61 メカルバム	OP	159 > 131	329 > 159	15.3	88.7	101.3	91.5	90.0	87.7	97.1	86.0
62 メタクリホス	OP	208 > 180	240 > 180	9.4	77.2	91.0	87.6	93.7	78.7	64.7	75.5
63 メタミドホス	OP	141 > 95	141 > 79	6.7	74.5	87.2	90.7	87.4	93.5	110.0	78.2
64 メチダチオン	OP	145 > 85	145 > 58	15.7	90.6	98.7	99.2	102.3	91.5	92.2	89.4
65 メビンホス (E), (Z)	OP	192 > 127	127 > 109	8.6	84.0	98.0	95.4	101.8	86.4	96.3	85.8
66 モノクロトホス	OP	192 > 127	127 > 109	11.4	86.2	82.1	86.7	90.1	78.4	99.5	85.1

\* 分類 OP : 有機リン系農薬, CA : N-メチルカルバメート系農薬, 無印 : その他の系統の農薬  
回収率が目標値を満たしたものは、選択性、併行精度及びS/N比も目標値を満たした。

表1 続き

農薬	分類*	測定イオン (m/z)		RT (分)	回収率 (%)						
		定量	確認		冷凍えび ドリア	冷凍餃子	白菜 キムチ	冷凍あじ 竜田揚げ	レトルト カレー	赤ワイン	鶏砂肝
67 XMC	CA	122 > 107	122 > 77	10.1	86.6	97.9	97.9	104.9	87.6	93.8	95.1
68 イソプロカルブ	CA	121 > 77	136 > 121	9.9	85.2	95.8	92.7	95.8	82.2	89.4	83.3
69 カルバリル	CA	144 > 115	201 > 144	13.8	92.3	96.2	97.0	102.6	85.9	91.5	90.7
70 カルボスルファン	CA	160 > 62	160 > 57	18.5	119.0	102.0	71.1	134.5	113.2	0.0	91.8
71 カルボフラン	CA	164 > 149	164 > 103	12.0	76.8	88.0	85.7	98.6	81.9	102.9	99.1
72 ピリミカルブ	CA	238 > 166	166 > 96	13.0	87.1	96.4	99.8	96.9	87.6	101.8	86.8
73 フエノブカルブ	CA	121 > 77	150 > 121	10.6	86.0	95.4	94.6	103.4	91.2	88.9	88.1
74 フラチオカルブ	CA	163 > 107	163 > 135	19.2	86.5	101.1	102.7	107.2	94.1	97.1	53.2
75 ベンダイオカルブ	CA	166 > 151	223 > 166	11.3	90.2	95.2	95.2	101.4	88.4	95.7	89.6
76 ベンフラカルブ	CA	190 > 74	190 > 144	19.9	194.0	175.8	143.1	93.3	194.9	0.0	122.8
77 メチオカルブ	CA	168 > 153	153 > 109	14.2	94.2	102.5	104.7	112.9	93.2	103.6	110.7
78 アセタミブリド		152 > 116	207 > 166	18.7	94.8	120.3	139.7	112.8	114.7	75.6	126.0
79-1 テトラメトリン I		164 > 77	164 > 107	18.6	90.3	97.2	109.5	103.4	93.2	99.3	95.7
79-2 テトラメトリン II		164 > 77	164 > 107	18.8	90.7	96.0	112.1	104.4	89.8	97.4	93.9
80 フィブロニル		367 > 213	351 > 255	15.1	93.4	99.5	103.4	102.8	91.3	101.7	86.3
81-1 フエノトリン I		183 > 168	183 > 153	19.2	82.0	83.2	87.2	125.2	72.5	91.1	107.0
81-2 フエノトリン II		183 > 168	183 > 153	19.3	68.2	77.1	76.1	88.2	75.1	75.5	87.5
82-1 ペルメトリン (cis)		183 > 168	163 > 127	20.5	58.4	89.8	84.2	107.8	80.4	69.4	92.9
82-2 ペルメトリン (trans)		183 > 168	163 > 127	20.6	72.9	87.8	97.5	99.0	80.6	80.5	103.5
83-1 レスマトリン I		171 > 128	171 > 143	18.2	71.9	48.9	89.0	91.4	75.2	87.9	103.5
83-2 レスマトリン II		171 > 128	171 > 143	18.3	74.9	33.6	68.4	87.2	72.6	82.2	84.7

\* 分類 OP: 有機リン系農薬, CA : N-メチルカーバメート系農薬, 無印: その他の系統の農薬  
回収率が目標値を満たしたものは、選択性、併行精度及びS/N比も目標値を満たした。

: 回収率が目標値を満たさなかったもの

表2 LC-MS/MS測定対象農薬、測定イオン及び性能評価結果

農薬	分類*	測定イオン (m/z)		RT (分)	回収率 (%)						
		定量	確認		冷凍えび ドリア	冷凍餃子	白菜 キムチ	冷凍あじ 竜田揚げ	レトルト カレー	赤ワイン	鶏砂肝
84 アラニカルブ	CA	400 > 238	400 > 91	10.1	91.9	52.7	83.7	82.5	86.4	17.0	63.9
85 アルジカルブ	CA	208 > 116	208 > 89	8.4	79.9	96.0	84.3	85.7	64.7	85.0	78.8
86 アルドキシカルブ	CA	240 > 86	240 > 148	5.3	88.8	96.0	90.7	89.2	91.2	93.8	82.7
87 オキサミル	CA	237 > 72	237 > 90	5.8	91.5	96.5	89.3	95.6	90.3	91.6	71.5
88 チオジカルブ	CA	355 > 88	355 > 108	9.4	50.4	39.8	83.6	4.1	80.2	46.1	2.2
89 メゾミル	CA	163 > 88	163 > 106	6.2	115.5	124.5	94.5	158.0	93.0	114.5	132.6
90 ジノテフラン		203 > 129	203 > 114	4.9	87.6	91.9	90.2	82.4	91.6	95.7	72.0

\* 分類 CA : N-メチルカーバメート系農薬、無印: その他の系統の農薬

回収率が目標値を満たしたものは、選択性、併行精度及びS/N比も目標値を満たした。

: 回収率が目標値を満たさなかったもの

表3 GC-MS/MS測定条件

GC	
カラム	VF-5ms (Agilent Technologies社) 内径0.25 mm, 長さ30 m, 膜厚0.25 μm
カラム昇温条件	50°C (1分) → -25°C/分 → 125°C (0分) -10°C/分 → 300°C (10分)
キャリアガス	ヘリウム
流量	クロルピリホスメチルの保持時間を 13.5 分に設定して調整 (リテンションタイムロック使用)
注入口温度	250°C
注入量	1 μL
注入方法	スプリットレス
MS/MS	
イオン源温度	320°C
JetClean 水素流量	0.4 mL/分 (測定とクリーニング)
イオン化法	電子イオン化 (EI) (70 eV)
測定モード	選択反応モニタリング (SRM)

表4 LC-MS/MS測定条件

LC	
カラム	CAPCELL CORE ADME (㈱大阪ソーダ) 2.1 mmI.D.×100 mm, 粒子径2.7 μm
ガードカラム	SUMIPAX Filter HB (㈱住化分析センター)
カラム温度	40°C
移動相	A液 : 5 mM酢酸アンモニウム水溶液 B液 : 5 mM酢酸アンモニウム ・メタノール溶液
グラジエント	B液 (%) : 0分 (5%) → 10分 (100%) -15分 (100%) → -16分 (5%) (直線グラジエント)
流量	0.3 mL/分
注入量	5 μL
MS/MS	
イオンスプレー	5500 V
脱溶媒ガス温度	600°C
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化, ポジティブモード (ESI+)
分析モード	選択反応モニタリング (SRM)

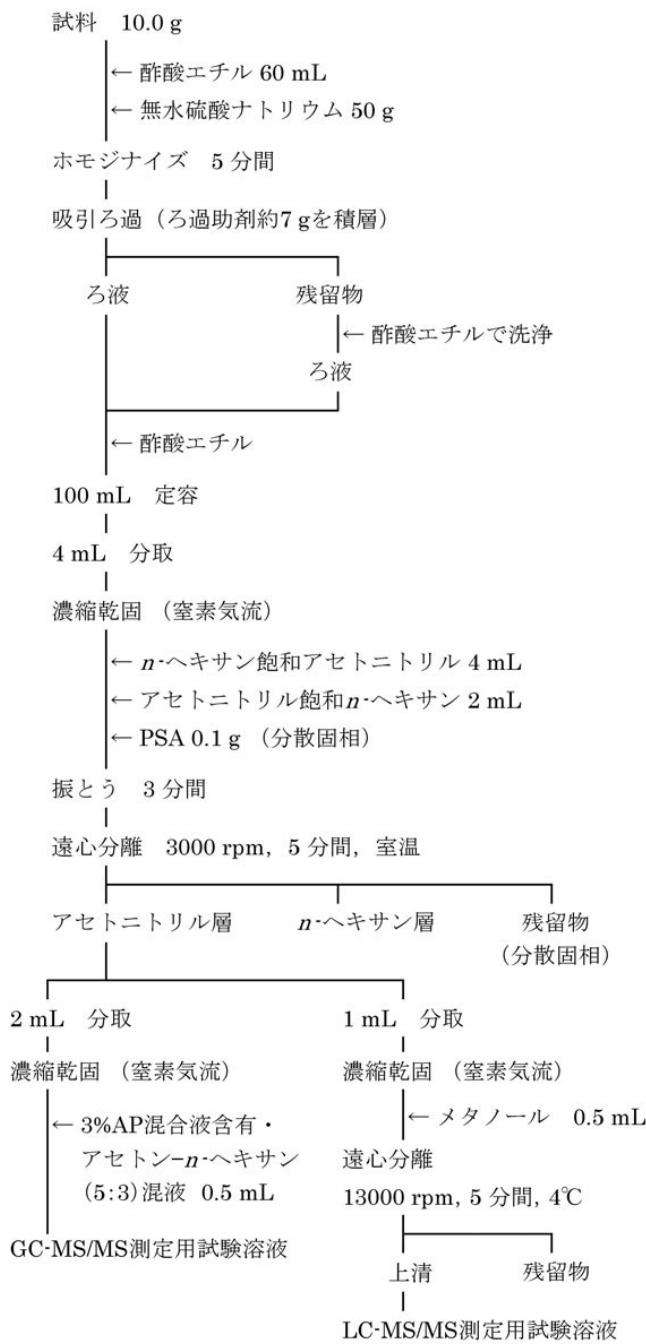


図1 試験溶液の調製方法

### 3. 性能評価

各試料について、3併行で添加回収試験を実施した結果を表1及び表2に示した。

有機リン系農薬は、全試料において選択性、回収率、併行精度及びS/N比の全てのパラメータが目標値を満たした（表1）。既報では多くの試料においてホルモチオニンの回収率が50%未満であったが、今回、試験溶液の調製方法を簡便化したことから、精製操作における農薬の損失が抑制され、回収率の向上に繋がった可能性が考えられた。

表5 性能評価における性能パラメータ及び目標値

性能パラメータ	目標値
選択性	プランク試料から測定を妨害するピーク（妨害ピーク）が検出されないこと。妨害ピークを認める場合は、添加濃度（0.1 mg/kg）に相当する検量線用混合標準溶液（GC-MS/MS : 0.04 mg/L, LC-MS/MS : 0.02 mg/L）のピーク面積の1/3未満であること。
回収率	添加回収率の平均値が50%～200%であること。
併行精度	相対標準偏差（RSD）が30%未満であること。
S/N比	回収率の評価で得られたピークのS/N比が10以上であること。

有機リン系以外の農薬についても、全試料において回収率は200%未満であり、多くの農薬が性能評価に適合した（表1及び表2）。性能評価に適合しなかった農薬のうち、チオジカルブは冷凍餃子、冷凍あじ竜田揚げ、赤ワイン及び鶏砂肝の4試料、アラニカルブは赤ワインにおいて回収率が50%未満となつたが（表2）、2農薬ともに、試料成分の影響によりメソミルに分解したことが回収率低下の原因の1つと考えられた<sup>7,8)</sup>。なお、冷凍あじ竜田揚げにチオジカルブのみを添加して検討を行つたところ、チオジカルブだけでなくメソミルも検出されたことから、チオジカルブが分解した場合であつても、メソミルの検出により原因農薬の推測は可能であると考えられる。また、赤ワインにおけるカルボスルファン及びベンフラカルブの2農薬については、ピークが検出されなかつた（表1）。この2農薬については、GC分析において試料成分の影響等によりカルボフランに分解されやすいことが知られている<sup>9)</sup>。そこで、LC-MS/MSによる測定を実施したところ、GC-MS/MSの結果と同様に、ピークが検出されなかつた。このことから、この2農薬については、赤ワイン中の成分の影響により、試験溶液調製時に分解した可能性が考えられた。なお、この2農薬を赤ワインに個別に添加してGC-MS/MSで測定したところ、それぞれカルボフランのピークは検出されたことから、2農薬の混入事例であつても、カルボフランの検出により、チオジカルブの例と同様に、原因農薬の推測は可能であると考えられる。ただし、この2農薬は、GC-MS/MS測定におけるAPの影響により、機器の状態によっては標準溶液であつてもカルボフランへの分解が促進し、2農薬のピークが検出されない現象が認められた。一方、LC-MS/MS測定では、このような現象は認められなかつたことから、2農薬が検出されない赤ワインを除く試料については、今後、LC-MS/MSによる性能評価を

実施する必要があると考える。

### まとめ

既報の試験法を改良し、対象農薬を追加してGC-MS/MS及びLC-MS/MSを用いた食品中の農薬の迅速試験法を構築した。有機リン系農薬及びN-メチルカーバメイト系農薬等から選択した90農薬のうち、冷凍えびドリア、白菜キムチ及びレトルトカレーは全農薬、冷凍餃子は88農薬、冷凍あじ竜田揚げ及び鶏砂肝は89農薬、赤ワインは86農薬が性能評価に適合した。既報で不適合であった有機リン系農薬は全て適合となった。多様な食品試料において多種の農薬が性能評価に適合したことから、本法は、より広範囲の健康危機事例に適用できる有用な試験法であると考える。

### 文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡：加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について、平成25年3月26日
- 2) 福光徹、小菅教仁、脇ますみ、林孝子、岸弘子：健康危機管理に係る食品中に含まれる農薬の迅速試験法の検討、神奈川衛研報告、47, 14-19 (2017)
- 3) EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, Use of Analyte Protectants in GC-Analysis: a way to improve peak shape and reduce decomposition of susceptible compounds <[http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/EURL\\_Observation-APs.pdf](http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/EURL_Observation-APs.pdf)> (2020/4/30 アクセス)
- 4) EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides, What to pay attention to when using Analyte Protectants (AP) <[https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/AP\\_UsingAP\\_SRM.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/AP_UsingAP_SRM.pdf)> (2020/4/30 アクセス)
- 5) 杉立久仁代、穴沢秀峰、中井隆志、中村貞夫：JetCleanセルフクリーニングイオン源搭載GC/MS/MSを用いた食品中残留農薬分析におけるマトリックス効果の低減、アジレント・テクノロジー(株)アプリケーションノート
- 6) Akutsu, K., Kitagawa, Y., Yoshimitsu, M., Takatori, S., Fukui, N., Osakada, M. et al. : Problems and solutions of polyethylene glycol co-injection method in multiresidue pesticide analysis by gas chromatography-mass spectrometry: evaluation of instability phenomenon in type II pyrethroids and its suppression by novel analyte protectants, Anal. Bioanal. Chem., 410 (13), 3145-3160. (2018)
- 7) 永山敏廣、小林麻紀、塩田寛子、森野雅世、伊藤正子、田村行弘：農産物中のN-メチルカーバメイト系農薬分析法、食品衛生学雑誌、35(5), 470-478 (1994)
- 8) 伊藤正子、永山敏廣、小林麻紀、橋本常生、羽石奈穂子、田村康宏ほか：HPLCによる農産物中アラニカルブの分析法、食品衛生学雑誌、39(3), 218-224 (1998)
- 9) 外海泰秀、中村優美子、津村ゆかり、柴田正、木村実加、大田光恵ほか：ベンフラカルブ及びカルボスルファンのGC分析に及ぼす食品由来成分の影響、食品衛生学雑誌、36(4), 506-515 (1995)

## 短報

### pH標準液の安定性の検討

外館史祥, 甲斐茂美, 岩橋孝祐,  
羽田千香子, 熊坂謙一

### Stability of pH standard solutions under various storage conditions

Fumiaki SOTODATE, Shigemi KAI,  
Takayuki IWASHI, Chikako HADA,  
Kenichi KUMASAKA,

#### 緒言

医薬品検査を始め理化学的な試験検査の品質保証において、試薬・試液及び標準品等の品質は、重要な管理事項の一つである。その中でもpH標準液はガラス電極計を用いたpH計の校正に必要不可欠なものであり、試料の測定のみならず、緩衝液や移動相のpH調整にも必要となる。

pH標準液は、JIS Z8802「pH測定方法」<sup>1)</sup>及び日本薬局方一般試験法pH測定法<sup>2)</sup>に内容は一部異なるものの、それぞれ6種類の液性とその調製方法について規定されているが、pH標準液の使用期限については明確な規定がないため、各試験機関の使用実態に基づいて設定する必要がある。

我々は既報<sup>3)</sup>にて、開封後のpH標準液のうち、フタル酸塩pH標準液、中性りん酸塩pH標準液及びほう酸塩pH標準液のpH安定性について、使用状況を反映したモデルケースを設定して検討し、開封後16週目まで安定であることを報告した。pH標準液が安定性の許容範囲内であった理由として、防腐剤が添加されていたこと、冷蔵保存であったこと及び採取回数が週1回であったこと等考えられたが、その要因については明らかではない。そこで本研究では、より詳細な要因を検討するため、各試験機関の様々な使用実態を想定し、防腐剤の有無、保存温度及び使用回数について検討を行った。さらに、pH標準液用粉末試薬を用いたpH標準液の安定性についても検討した。

#### 方法

##### 1. 試薬及び装置

pH標準液は富士フィルム和光純薬工業株式会社及び関東化学株式会社製のフタル酸塩pH標準液(pH4.01)、中性りん酸塩pH標準液(pH6.86)及びほう酸塩pH標準液(pH9.18)(いずれもJCSS第2種、500mL、pHは25°Cの値)を用いた。ほう酸塩pH標準液用粉末試薬は東亜ディーケー株式会社製を用い、製品に記載されている注意事項に従い粉末を、煮沸して冷却した超純水500mLに溶解し、ほう酸塩pH標準液(pH9.18)を調製した。なお調製後の保存容器は高密度ポリエチレン製を用いた。

pHメーターは株式会社堀場製作所製LAQUA F-74SP、pH電極には同社製の複合電極9615-10Dを使用した。なお、pHメーターは、事前に日本薬局方一般試験法pH測定法の規定に準じて、中性りん酸塩pH標準液を用いた5回繰り返し測定による繰り返し性、温度指示値の精度及びpH標準液の規定値と実測値の誤差について適合することを確認した。また、恒温水槽はタイテック株式会社製Personal-10/SX-10Rを使用した。

##### 2. pH測定温度

pH測定時は、冷蔵保存中の各pH標準液の温度変化を抑えるため、50mLプラスチック製チューブに速やかに一定量を採取し、恒温水槽にて25.0±0.1°Cの温度範囲で保温後、測定した。

##### 3. 試験方法

既報<sup>3)</sup>では、フタル酸塩pH標準液、中性りん酸塩pH標準液及びほう酸塩pH標準液について、2~5°Cで冷蔵保存している各同一容器より週1回使用することを想定し、1週間毎に25mLずつ16週間繰り返して採取するモデルケースを設定した。また、採取したpH標準液は元の容器に戻さず廃棄した。本報では、このモデルケースを基本条件とし、下記の測定条件1~4により、pH標準液の安定性を検討した。また、その概要について表1に示した。

測定条件1として、防腐剤不含のフタル酸塩pH標準液及び中性りん酸塩pH標準液を用い、基本条件と同様の方法で測定した。

測定条件2として、pH標準液用粉末試薬より調製したほう酸塩pH標準液について基本条件と同様の方法で測定した。

測定条件3として、ほう酸塩pH標準液について、冷蔵ではなく実験室内(室温)保存とした。その他は、基本条件と同様の方法で測定した。

測定条件4として、フタル酸塩pH標準液、中性りん酸塩pH標準液及びほう酸塩pH標準液について、同一容

表1 本試験の概要

測定条件	測定pH標準液	防腐剤※有無	製品形態	保存温度	採取(回/週)	採取量(mL)
基本	pH4,7,9	あり	液体	冷所	1	
1	pH4,7	なし	液体	冷所	1	
2	pH9	なし	粉末	冷所	1	25
3	pH9	なし	液体	室温	1	
4	pH4,7,9	あり	液体	冷所	2	12.5

※pH9標準液に防腐剤は不含である。また窒素置換は実施していない

基本の測定条件と異なる箇所を灰色で示した

フタル酸塩:pH4, 中性りん酸塩:pH7, ほう酸塩:pH9

器より週2回12.5 mLずつ、16週間繰り返して採取した。その他は、基本条件と同様の方法で測定した。なお、測定条件1～4において、既報<sup>3)</sup>の検討結果を踏まえ保存容器内空気の窒素置換は不要と判断し、実施していない。

検討中のpH標準液のpHは、開封時（0週目）、4週目、8週目、12週目及び16週目に測定し、開封時（0週目）と比較した各測定時点におけるpHの変動値を求めた。なお、各測定時点におけるpHメーターの校正には、富士フィルム和光純薬株式会社製の3種類のpH標準液（フタル酸塩、中性りん酸塩及びほう酸塩）を上記検討用のpH標準液とは別に開封し、0週目に新たに開封・使用したものは続けて4週目のpH校正に使用し、また、8週目に新たに開封・使用したものは続けて12週目及び16週目のpH校正に使用した。

本検討における測定数は、いずれもn=1とし、安定性の許容範囲は初回測定時のpH値に対してJCSS第2種の精度である±0.015とした。

## 結果及び考察

### 1. 防腐剤不含のpH標準液の安定性

現在、試薬メーカーなどから多種多様なpH、形態及び品質規格のpH標準液が市販されているが、同種のpH標準液であっても、その含有成分はメーカーによって細部で異なる場合がある。例えば、ある試薬メーカーのフタル酸塩pH標準液には0.04%のチモールが、中性りん酸塩pH標準液には0.1%のアジ化ナトリウムが防腐剤として添加されているのに対し、別の試薬メーカーの同種製品には含まれていない。そこでpH安定性に対する防腐剤の影響について確認するため、市販の防腐剤不含であるフタル酸塩pH標準液及び中性りん酸塩pH標準液の安定性について測定条件1に基づき検討した。なお、ほう酸塩pH標準液については、市販の防腐剤含有製品を確認できなかったことから、本検討の対象外とした。

図1-1に防腐剤不含の各pH標準液における開封後

のpHの変動を示した。その最大変動値について、フタル酸塩pH標準液では、既報<sup>3)</sup>にて報告した防腐剤含有製品と比較し同程度であったが（既報-0.014に対し本検討-0.013）、中性りん酸塩pH標準液では防腐剤含有製品と比較し、より大きく変動していた（既報：-0.006に対し本検討：-0.012）。なお、これらpH標準液の最大変動値は、いずれも16週目まで安定性の許容範囲内であった。

本検討において、防腐剤不含であっても16週間安定性の許容範囲内であった要因の一つとして、冷蔵保存の可能性が考えられる。低温菌は27～28℃の室温で最も旺盛に増殖する<sup>4)</sup>ため、25℃付近の保存ではこれらの細菌が増殖することによりpHの安定性に影響する懸念が考えられるが、防腐剤不含であっても冷蔵保存下では微生物の増殖を抑制した可能性が考えられた。

### 2. pH標準液用粉末試薬を用いたpH標準液による安定性

試験検査に使用するpH標準液は、JCSS認定事業者などからトレーサビリティのとれた値付け製品を購入し使用するのが一般的と考えられる。一方、保証期限が液体製品より長く設定されているpH標準液用粉末試薬を用いてpH標準液を調製している試験機関もある。ほう酸塩pH標準液用粉末試薬では、純水は、電気導電率が $2 \times 10^{-4}$  S/m (25℃) 以下で二酸化炭素を含まない蒸留水またはイオン交換水を用いることや、袋の中に試薬が残らないように袋内を純水で洗うこと等の注意事項が記載されていることから、そのpH標準液の調製次第でpHの安定性に影響を与えると考えられた。そこで、市販のpH標準液用粉末試薬を用いて調製したほう酸塩pH標準液の安定性について測定条件2に基づき検討した。その結果、図1-2に示す通り、ほう酸塩pH標準液のpHは経時に徐々に低下したが、その最大変動値は-0.013であり、16週目まで安定性の許容範囲内であった。また、調製時（0週目）におけるpHの実測値は9.179であり、本製品で規定しているpHの9.18と一致した。よって、製品の注意事項の記載通りに調製することで、そのpH値は正確であり、また、保存容器に高密度ポリエチレン製を用い、冷蔵保存する等適切な保存条件下ではpHは安定であると考えられた。

### 3. 保存温度の違いによる安定性

試薬は、保存が必要な場合、試料及び化学種の性状に応じて光、酸素、水分（湿度）及び温度などの影響に注意する必要がある。また、pH標準液については、製品に添付されている証明書に保存条件として25℃以下と記載されている。よって保存温度がpH標準液の安定性に影響を及ぼす要因の一つと考えられる。四角目らの報

告<sup>6)</sup>から、保存温度の影響が大きいほう酸塩pH標準液の室温保存時のpH安定性について測定条件3に基づき検討した。

その結果、図1-3に示した通り、16週目までの最大変動値は、既報<sup>3)</sup>の冷蔵保存したほう酸塩pH標準液と同様に安定性の許容範囲内であった（既報-0.008に対し本検討-0.004）。

一般的に二酸化炭素の水に対する溶解度は圧力が一定であるならば温度が高いほど低いため、冷蔵保存と比較し室温保存の方が二酸化炭素は溶けにくい。よって、冷蔵保存と比較し室温保存の方がより二酸化炭素がpH標準液に溶け込みにくくなるためpHが安定すると考えられる。本検討では、試験期間中の最高室温は30°Cを超えている時もあり、メーカーの保存条件である25°C以下から逸脱しており、pHの安定性にも影響を及ぼすことが想定されたが、検討の結果は安定性の許容範囲内であった。しかし、試験室等に放置した場合、季節によっては室内温度の変動が大きく、一定の温度管理幅で保管

することが困難であることから、そのpHの安定性を通常で担保するのが難しいと考えられる。そのため、保存時の温度条件については製品の規定の温度条件に従うとともに、四角目らの報告<sup>6)</sup>にある至適条件に十分に配慮し、低温かつ一定の温度変動幅で保存することが望ましいと考えられた。

#### 4. 採取回数の違いによる安定性

一般にpH標準液を繰り返し使用する場合は、容器から一定量取り出して使用するため、容器内の空気は徐々に増大し、その空気も入れ替わる。そのため、使用頻度が増加すれば空気とpH標準液との接触もより多くなり、特にほう酸塩pH標準液の安定性に影響を及ぼすものと予想される。そこで、本検討では毎週2回ずつ採取した時の各pH標準液の安定性について測定条件4に基づき検討した。

その結果、図1-4に示した通り、各pH標準液の最大変動値は、既報<sup>3)</sup>で示した週1回使用時と同様に16週目まで安定性の許容範囲内であった（フタル酸塩pH標

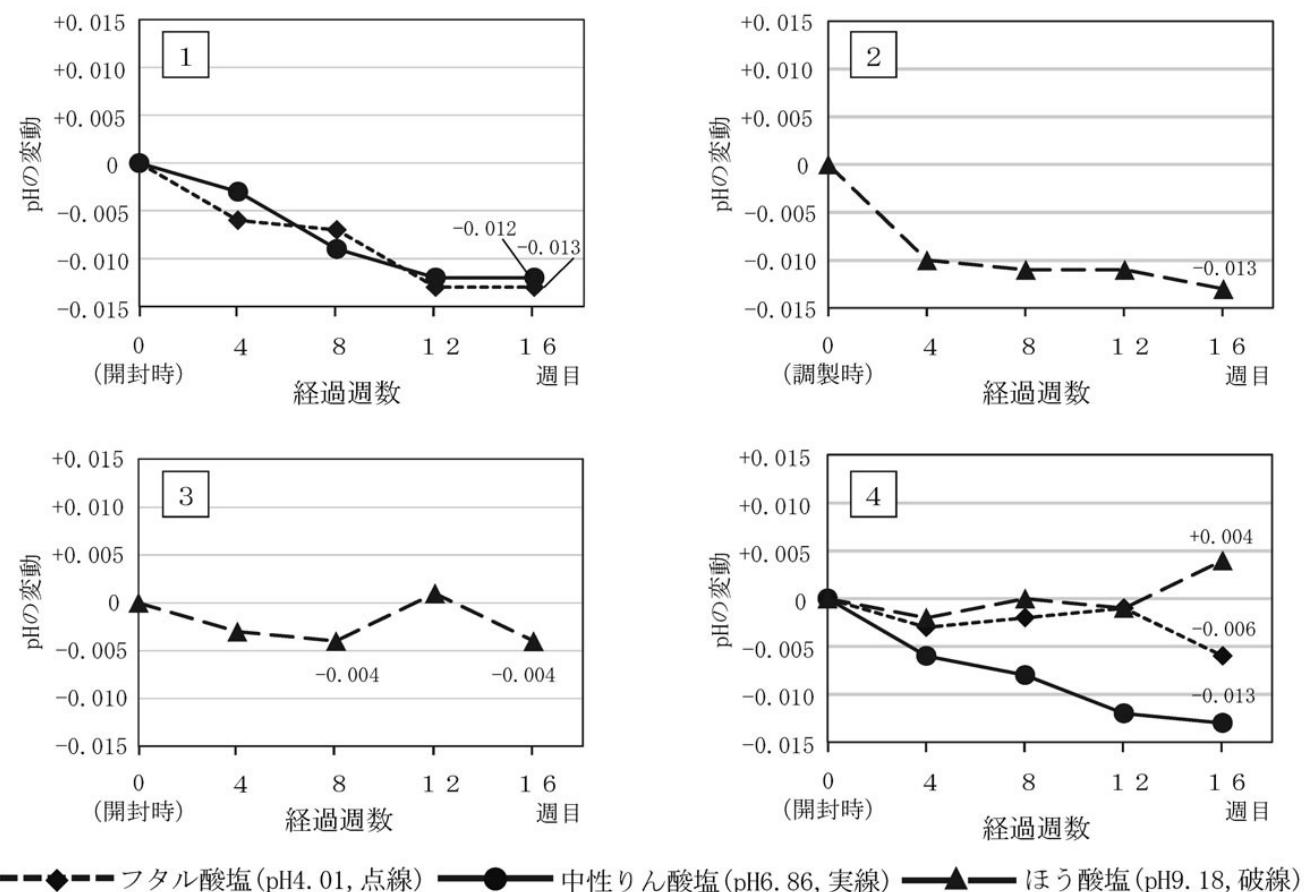


図1 各種条件下におけるpH標準液のpH値の変動

1は防腐剤不含のpH標準液、2はpH標準液用粉末試薬を用いたpH標準液、3は室温保存におけるpH標準液、4は週2回採取におけるpH標準液のpH値の変動について、開封時（0週目）のpHに対する各測定回の変動を示した。図内、折れ線に付してある数値は最大変動値を示す。

準液：既報-0.014に対し本検討-0.006，中性りん酸塩pH

標準液：既報-0.006に対し本検討-0.013，ほう酸塩pH標

準液：既報-0.008に対し本検討+0.004).

本検討では週2回使用と既報<sup>3)</sup>よりも使用頻度を増加させたが，pHの変動を引き起こすほどの影響は無いと考えられた。

### まとめ

本検討では，防腐剤の有無，保存温度及び使用回数についてpH標準液の安定性の要因を検討したところ，対象としたpH標準液は，16週間安定性の許容範囲内であった。また，pH標準液用粉末試薬を用いたpH標準液の安定性についても検討したところ，16週間安定性の許容範囲内であった。

本検討では，メーカー3社の製品のpH標準液の安定性について検討したが，この他にもpH標準液製品には防腐剤の有無だけでなく，小分け製品など多種多様な形態があること，さらにJCSSには第2種の他により精度の良い第1種もあることから，それぞれ使用する製品・

規格に応じ，各試験機関の使用状況ごと，適切に検討する必要がある。

### 参考文献

- 1) 一般財団法人日本規格協会：JIS Z8802: pH測定方法，pp.1-8，一般財団法人日本規格協会(2011)
- 2) 厚生労働省告示第64号：第十七改正日本薬局方（平成28年3月7日），一般試験法2.54 pH測定法
- 3) 外館史祥，熊坂謙一，羽田千香子，甲斐茂美：冷蔵保存における開封後のpH標準液の安定性，神奈川県衛生研究所研究報告，47,29-31(2017)
- 4) 獣医公衆衛生学，第3版，高島郁夫，熊谷進編，p p.267-268，文永堂出版(2004)
- 5) 一般財団法人日本規格協会：JIS K8001:試薬試験法通則，pp1-142，一般財団法人日本規格協会(2017)
- 6) 四角目和広，栗原力，中村進，久保田正明：pH標準液の保存条件の検討，分析化学，37，17 - 21(1988)

## 短報

# ヘリウムガス不足に対応した纖維製品中防虫加工剤の分析法

西以和貴<sup>1</sup>, 上村 仁<sup>1</sup>, 河上強志<sup>2</sup>

## Analytical method for mothproofing agents in textile products under conditions of insufficient helium gas supply.

Iwaki NISHI, Hitoshi UEMURA,  
and Tsuyoshi KAWAKAMI

### はじめに

有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（昭和48年10月12日法律第102号、以下「家庭用品規制法」）において、纖維製品に防虫剤として用いられるディルドリン及び4, 6-ジクロル-7-(2,4,5-トリクロルフェノキシ)-2-トリフルオルメチルベンズイミダゾール（DTTB）が規制対象となっている。これらの物質に対する試験法は家庭用品規制法施行規則（昭和49年9月26日厚生省令第34号）で定められているが、ディルドリンは昭和53年、DTTBは昭和57年の規制導入当初から試験法が改正されていない。試験法制定当時から約40年が経過していることから、現在の分析技術水準から乖離した分析機器や有害な試薬の使用、これら2物質に別々の試験法が規定されている非効率性などが問題となっている。

我々はこれまでの研究で、現行の試験法よりも効率性・安全性に優れた新試験法を開発した<sup>1)</sup>。この試験法はヘリウムガスを使用するガスクロマトグラフ/質量分析計（GC/MS）を用いるものであるが、昨今ヘリウムガス供給不足が問題となっていることから<sup>2)</sup>、その代替分析法が利用可能かを検討する必要がある。そこで本研究では、ディルドリン及びDTTB試験法において水素キャリアガス-GC/MSを代替分析法として検討した。また、水素キャリアガス-GC/MSは水素の安全性への懸念から導入が困難な機関があると想定されることから、更なる代替分析

法として、高速液体クロマトグラフ/フォトダイオードアレイ検出器（HPLC/PDA）についても検討を行った。

### 方法

#### 1. 試薬及び使用器具

ディルドリンはDr. Ehrenstorfer製、DTTBは富士フィルム和光純薬製のものを用いた。これらの純度はいずれも98%以上であった。また、内部標準物質として用いたフルオランテン-d<sub>10</sub>はC/D/N isotopes製、クリセン-d<sub>12</sub>は関東化学製を用いた。内部標準溶液として、フルオランテン-d<sub>10</sub>、クリセン-d<sub>12</sub>の1 μg/mL酢酸エチル溶液を調製した。メチル誘導体化試薬であるPhenyltrimethylammonium Hydroxide (PTAH) の0.2 mol/Lメタノール溶液はジーエルサイエンス製を用いた。塩化ナトリウム、リン酸、リン酸水素二ナトリウム・2水和物は富士フィルム和光純薬製の特級を用いた。また、塩酸は富士フィルム和光純薬製のアミノ酸自動分析用を用い、その他の溶媒はすべて富士フィルム和光純薬製の残留農薬・PCB試験用のものを用いた。

試料前処理カラムはアジレント・テクノロジー製のBond Elut PRS（充填剂量1 g）を用いた。

#### 2. 防虫加工剤試験法<sup>1)</sup>

試料0.5 gにメタノール50 mL及び濃塩酸 100 μLを加えた後、70°C、30分間で還流抽出した。抽出液をガラスろ過器（細孔記号2）でろ過し、ロータリーエバボレーターで濃縮後、メタノールで10 mLとした。この2 mLを採り、10% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液10 mL及びヘキサン4 mLを加えて振とう後、遠心処理を行った。ヘキサン層1 mLを採り、予めアセトン5 mL及びヘキサン10 mLでコンディショニングしたBond Elut PRSに負荷した。さらにヘキサン4 mLで洗浄後、空気または窒素を用いてカラムに残存する溶媒を除去した。その後、酢酸エチル/メタノール=(1/1 v/v) 5 mLで溶出し、同溶媒で5 mLに定容した。試験溶液1 mLに対し内部標準溶液を50 μLを加え、さらにDTTB分析用の試験溶液には0.2 mol/L PTAH溶液を100 μLを加えた。

#### 3. 添加回収試験及び定量下限値の算出

試料中のディルドリン及びDTTBの濃度が3 μg/g及び30 μg/gにおける添加回収試験（n=6）を行った。添加試料には、市販のウール100%のフェルトを用いた。定量下限値は、原則3 μg/g添加試料における分析結果の標準偏差の10倍から求めた。HPLC/PDAにおけるディルドリンの定量下限値のみ、感度不足のため30 μg/gの結果を用いて算出した。

1 神奈川県衛生研究所 理化学部

〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

nishi.vjb@pref.kanagawa.jp

2 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部

#### 4. 水素キャリアガス-GC/MSの分析条件

分析機器はアジレント・テクノロジーの7890B GC/5977B MSを用いた。キャリアガス流量は、水素キャリアガス使用開始後4日目までは0.6 mL/min, 4日目以降は0.4 mL/minとした。カラムはアジレント・テクノロジーのDB-5MS UI (長さ 20 m; 内径 0.18 mm; 膜厚 0.18 μm)を用い、カラムオーブンプログラムは100 °C(0.5分)→26°C/min→240°C→13°C/min→280°C(5分)に設定した。試料注入は2 μLをパルスドスプリットレスモード (50 psi, 1 min) で行った。注入口、トランスマッピングアダプタ、イオン源温度はそれぞれ240°C, 280°C, 300°Cとした。DTTBの誘導体化生成物は2種生成するが、より定量性に優れている保持時間が短い方(Me-DTTB-1)のピーク面積を用いて定量を行なった<sup>1)</sup>。

定量イオン(m/z)は263 (ディルドリン), 392 (Me-DTTB-1), 212 (フルオランテン-d<sub>10</sub>), 240 (クリセン-d<sub>12</sub>) とし、確認イオン(m/z)は277 (ディルドリン), 464 (Me-DTTB-1), 106 (フルオランテン-d<sub>10</sub>), 236 (クリセン-d<sub>12</sub>) とした。水素キャリアガス使用開始後3日目にオートチューニングを行い、チューニングファイルを作成した。以降は同じチューニングファイルを用いて検討を行った。

#### 5. HPLC/PDAの分析条件

HPLCシステムは、LC-30ADポンプ、SIL-30ACオートサンプラ、SPD-M30A フォトダイオードアレイ(PDA) 検出器およびCTO-20ACカラムオーブンから構成される島津製作所社製NexeraX2システムを用いた。カラムは化学物質評価研究機構のL-column 3 C18 (5 μm, 4.6×150 mm)を用い、確認試験用としてジエルサイエンスのInertSustain Phenyl (5 μm, 4.6×150 mm)についても検討した。溶離液はA:50mMリン酸緩衝液(pH 2.6), B:アセトニトリルを用い、流速1 mL/minのグラジエントモードで通液した。溶離液の組成は、試料注入から10分間でA:B=50:50から20:80まで直線的に変化させ、その組成を15分まで維持し、その後25分までに50:50へ直線的に変化させた。InertSustain Phenylカラム使用時は、溶離液の組成を試料注入から5分間でA:B=50:50から20:80まで直線的に変化させ、その組成を15分まで維持し、その後20分までに50:50へ直線的に変化させた。定量に用いた波長はディルドリンで215 nm, DTTBで265 nmとした。方法2. に示した方法で得られた試料溶液を、窒素気流下で乾固後、溶離液(A:B=50:50)に溶解し分析した。

#### 結果及び考察

##### 1. 水素キャリアガス-GC/MSを用いた分析の検討

水素キャリアガス-GC/MSの検討に当たっては、これまでヘリウムガスをキャリアガスとして用いてきたGC/MSのガスラインに3方コックで水素のラインを取り付けた機器を用いた。キャリアガスを水素に切り替え3日目後に、窒素 (m/z28) の値が十分に下がったことを確認し、オートチューニングを行ってから検討を始めた。

アジレント・テクノロジーの資料<sup>3)</sup>によると、水素キャリアガスへの切り替え後、1週間程度ベースラインが高い状態が続く場合があると報告されている。この現象は、配管等に付着した汚れが水素の還元作用によって溶出されることが原因として考えられている。そこで、溶媒(酢酸エチル/メタノール=1/1)の分析を連日行ってベースラインを確認したところ、10日目以降にその低下が落ちていた(データ不掲載)。当所の装置は設置場所等の都合により、ガス精製管以降の水素配管が比較的長くなっている。このようなケースでは、ベースラインの安定化には10日間程度かかる可能性があると考えられた。

また、ベースライン安定化の検討と併行して、分析対象物質のアバンダンスの変化に関する検討を行った。今回の分析対象物質はディルドリン及びDTTBであるが、DTTBはGC/MSによる分析にメチル誘導体化が必要であることから、DTTBの分析はディルドリンの検討後に検討することとした。したがって、まずはディルドリンと内部標準物質として用いたフルオランテン-d<sub>10</sub>及びクリセン-d<sub>12</sub>について検討を行った。

水素キャリアガス変更から3日目にディルドリン30 ng/mL及び、フルオランテン-d<sub>10</sub> 500 ng/mL、クリセン-d<sub>12</sub> 500 ng/mLの標準液を分析したところ、ディルドリンのピークは積分が困難なほど小さく、クリセン-d<sub>12</sub>のピークにはヘリウムキャリアガスの時には認められなかつた顕著なテーリングが認められた。クリセン-d<sub>12</sub>のテーリングは定性イオンm/z236が定量イオンm/z240より顕著であり、4日目においてもその傾向に変化はなかつた(図1)。この現象は水素によるイオン化への影響と考えられたことから、質量分析計に到達する水素の量を減らすため、カラム流量を当初の0.6 mL/minから0.4 mL/minに減らした。その結果、テーリングがやや小さくなり、m/z236とm/z240のピーク形状の差が小さくなつた。さらに、その後の7日目にはテーリングはほぼ認められなくなった(図1)。この結果から、このテーリングには、水素によるイオン化への影響に加え、配管等から溶出してきた汚れも影響していると考えられた。以上のことから、水素キャリアガスを用いる際は、ピーク形状を確認する必要があり、テーリング等が認められた場合は水素ガスの流量を下げることが対策として有効で

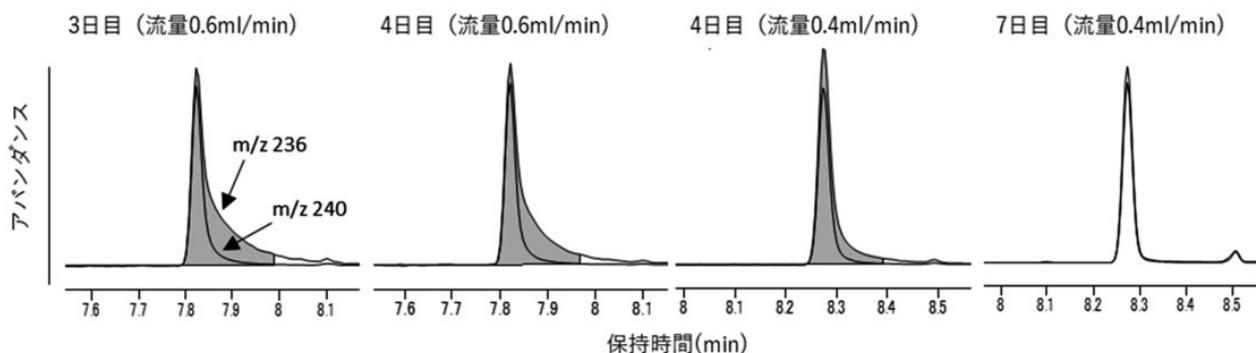


図1 水素キャリアガス切り替え後の経過時間及びカラム流量によるクリセン-d<sub>12</sub>のピーク形状の変化（定量イオンm/z 240に対し、定性イオン236の形状変化が顕著）

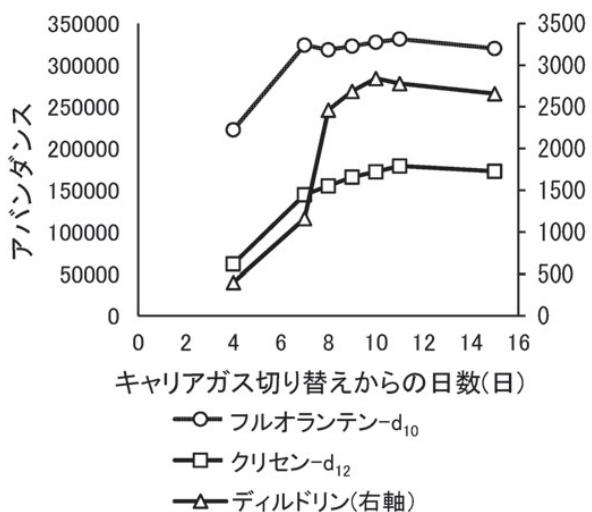


図2 水素キャリアガス切り替え後の各分析対象物質のレスポンスの変化（ディルドリン 3 ng/mL、フルオランテン-d<sub>10</sub> 500 ng/mL、クリセン-d<sub>12</sub> 500 ng/mL）

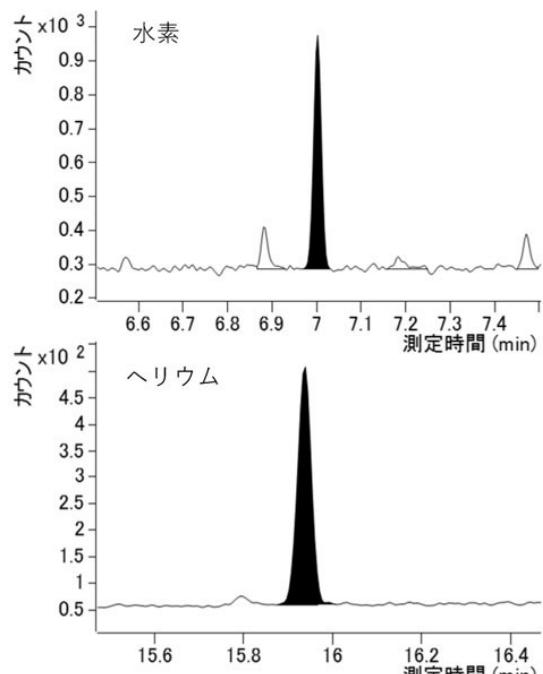


図3 水素キャリアガス時（上）とヘリウムキャリアガス時（下）のピークの比較（ディルドリン濃度 10 ng/mL）

あることが示唆された。

キャリアガス流量を0.4 mL/minにした4日目以降の、ディルドリン、フルオランテン-d<sub>10</sub>及びクリセン-d<sub>12</sub>のレスポンスの変化を図2に示した。フルオランテン-d<sub>10</sub>及びクリセン-d<sub>12</sub>は7日目にほぼ安定化していたのに対し、ディルドリンは7日目から8日目に急激にレスポンスが上昇し、以降10日目まで上昇し続けた。前述のとおり、ベースラインも10日目以降に安定化が認められたことから、以上のレスポンスの変化はベースラインによる影響が大きいと考えられた。また、今回の結果では、化合物ごとに安定化までの挙動が異なっていたことから、水素キャリアガスを用いる際は、すべての分析対象物質の測定の安定化を確認する必要があると考えられた。ベースライン安定化後のディルドリンのクロマトグラムはヘリウムキャリアガス時と比べてノイズが大きいものの、良好なピークが得られた（図3）。

ディルドリンの測定の安定化が確認できた後に、ディルドリンの検量線を作成したところ、 $R^2=0.99$ 以上の直線性の高い検量線が得られた（図4）。また、我々が開発した新試験法<sup>1)</sup>を用いて添加回収試験をn=6で行った。その結果、回収率及び相対標準偏差（RSD）は、基準値(30 μg/g)濃度で添加すると98.5%及び1.0%，基準値の1/10(3 μg/g)で88.7%及び6.8%と良好な結果が得られた。3 μg/gでの添加回収試験における定量値の標準偏差の10倍として定量下限値を算出したところ、1.8 μg/gであった。ヘリウムキャリアガス時の定量下限値は1.3 μg/gであり<sup>1)</sup>、そこからやや数値は上昇したもの、基準値より十分に低い値であることが分かった。以上より、繊維製品中のディルドリンの分析に水素キャリアガス-GC/MSは利用可能と考えられた。

DTTBはベンゾイミダゾール骨格を有することから、GC測定に当たっては誘導体化が必要である。我々が開発した新試験法<sup>1)</sup>では、注入口でメチル化反応が進行するPhenyltrimethylammonium Hydroxide (PTAH) を用いている。これまで、PTAHを水素キャリアガスで用

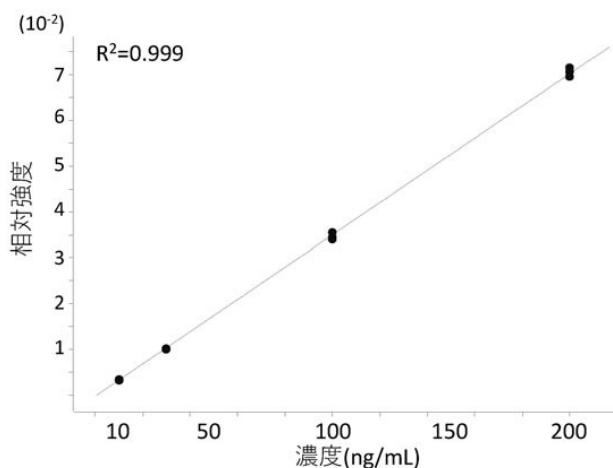


図4 水素キャリアガス-GC/MSにおけるディルドリンの検量線(10-200 ng/mL, 各点n=3)

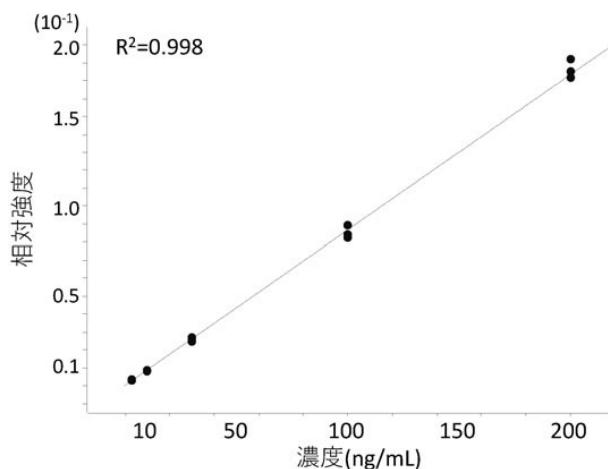


図5 水素キャリアガス-GC/MSにおけるDTTBの検量線(3-200 ng/mL, 各点n=3)

いた事例は報告されておらず、その影響は未知であったが、DTTBの検量線を作成すると、ディルドリンの時と同様に良好な直線性が得られた（図5）。また、添加回収試験の結果、回収率及びRSDは基準値（30 μg/g）で105.6%及び3.3%，基準値の1/10（3 μg/g）で89.1%及び4.5%と良好な結果が得られた。3 μg/gでの添加回収試験における定量値の標準偏差の10倍として定量下限値を算出したところ、1.3 μg/gであった。ヘリウムキャリアガス時の定量下限値は0.72 μg/gであり<sup>1)</sup>、そのおよそ2倍の値となったものの、基準値より十分に低い値であることが分かった。以上より、繊維製品中のDTTBの分析にも水素キャリアガス-GC/MSは利用可能と考えられた。

以上の検討により、ヘリウムの代替として水素をキャ

リアガスとして用いたGC/MSが利用可能であり、誘導体化試薬PTAHも使用可能であることが分かった。

## 2. HPLC/PDAを用いた分析の検討

水素キャリアガス-GC/MSの使用が水素の安全面等の理由により困難な検査機関も存在すると考えられることから、HPLC/PDAを用いた代替分析法についても検討を行った。

ディルドリンの吸収極大波長は215 nmであったことから、定量に用いる波長は215 nmが適切であると考えられた（図6）。GC/MSに比べて感度が低く、50 ng/mL未満では十分な大きさのピークを得ることができなかつた。しかしながら、基準値である30 μg/gを含有する試料を抽出した場合の試験溶液濃度である150 ng/mLを含む、50-2000 ng/mLの範囲における検量線を作成したところ、図7のようにR2=0.99以上の中良好な検量線が得られた。

続いて、DTTBのUVスペクトルを確認したところ、吸

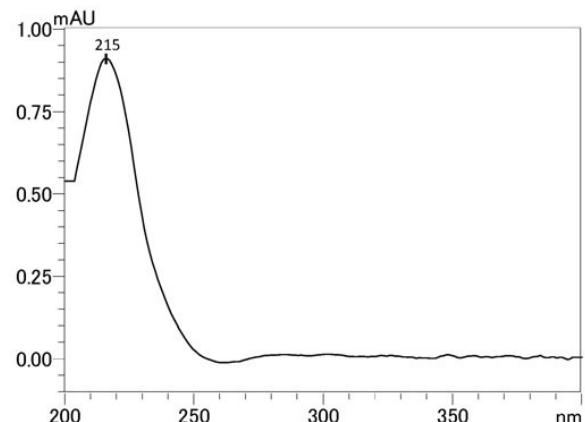


図6 ディルドリンのUVスペクトル

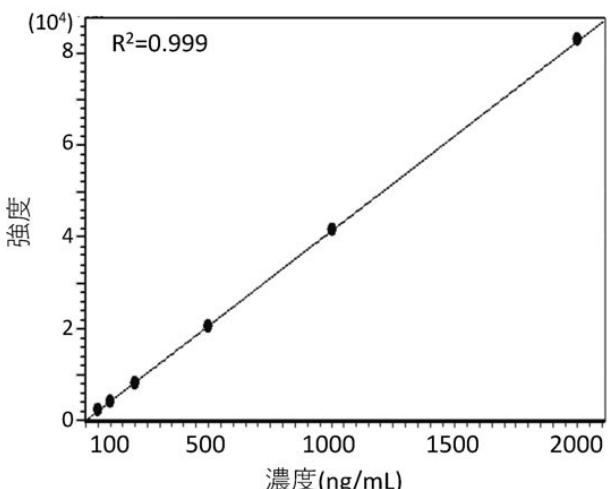


図7 HPLC/PDAにおけるディルドリンの検量線(50-2000 ng/mL, 各点はn=3の平均値)

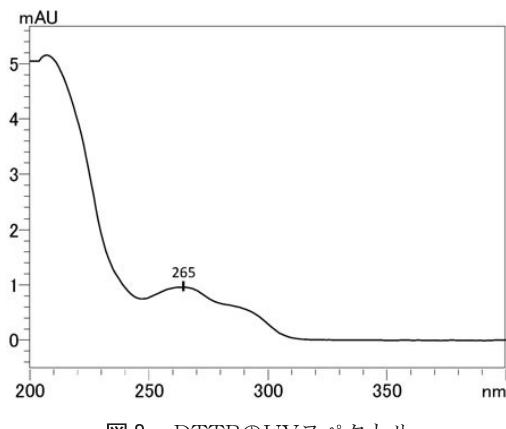


図8 DTTBのUVスペクトル

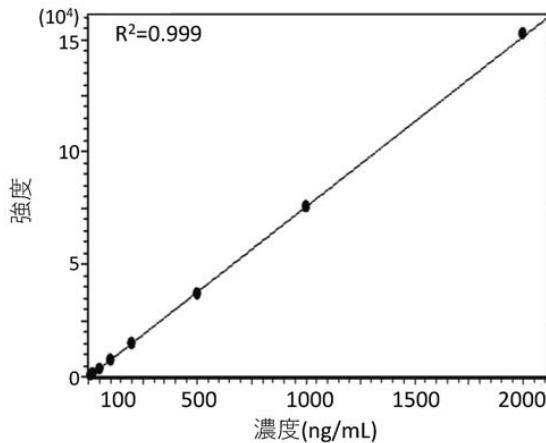
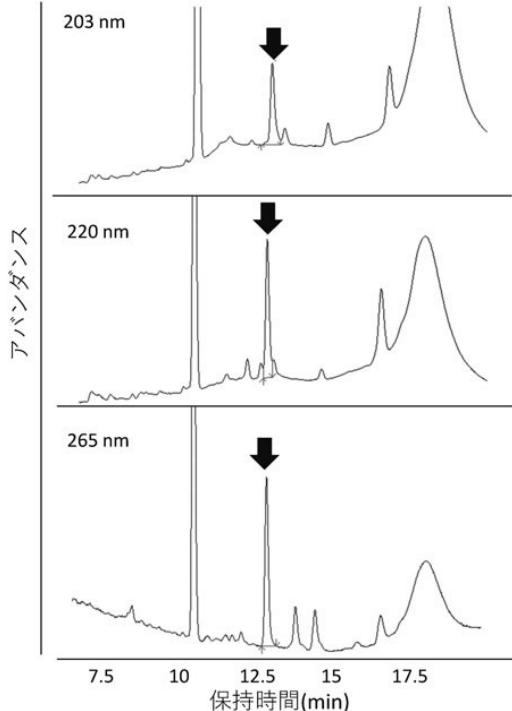


図10 HPLC/PDAにおけるDTTBの検量線（10-2000 ng/mL, 各点はn=3の平均値）

図9 測定波長ごとのDTTBのクロマトグラムの比較  
(上：波長203 nm, 中：波長220 nm, 下：波長265 nm)

吸極大波長は203 nm, 265 nmであった（図8）。三好ら<sup>4)</sup>はDTTB分析に波長220 nmを用いていたが、添加回収試料の試料溶液のクロマトグラムを確認すると、波長265 nmにおいて妨害ピークが少ない良好なクロマトグラムが得られることがわかった（図9）。したがって、DTTBの定量に用いる波長は265 nmとした。10-2000 μg/mLにおける検量線を作成したところ、図10のとおりR<sup>2</sup>=0.99以上良好な検量線が得られた。

次に、検討の結果で得られた分析条件を用いて添加回収試験を行った。ディルドリンは装置の感度不足のため基準値である30 μg/gで試験を行った。回収率は103.5%，RSDは1.7%と良好な結果が得られた。また、DTTBにつ

いては3 μg/g及び30 μg/g添加試料で試験を行った。回収率はそれぞれ105.9%及び100.6%，RSDは4.2%及び2.1%と良好な結果が得られた。さらに、ディルドリンは30 μg/g、DTTBについては3 μg/gにおける添加回収試験の結果を用いて定量下限値を算出したところ、ディルドリンが5.2 μg/g、DTTBが1.3 μg/gであった。ディルドリンの定量下限値がGC/MSのものよりかなり高かつたものの、いずれの値も基準値(30 μg/g)より十分に低い値であったことから、代替分析法としての要件は満たしていると考えられた。

一方で、HPLCはGC/MSでの分析よりも得られる定性情報が少ないとから、別途確認方法が必要と考えられた。本研究で用いたPDA検出器はUVスペクトルを同時に得ることが可能であるため、標準溶液と試験溶液のスペクトルを比較することで、確認が可能と考えられる。実際に前述の添加回収試験の試料で標準溶液のものとのスペクトル比較を行ったところ、図11の様に良好な一致が認められた。また、更なる確認手法として、異なる保持メカニズムのカラムを用いた時の保持時間を比較する方法を検討した。本研究では、芳香族化合物に特異性の高いInertSustain Phenylカラムを用いて分析を行ったところ、図12に示したようにクロマトグラムは変化したが、各物質の保持時間（ディルドリン: 6.73 min, DTTB: 6.90 min）は標準溶液の保持時間（ディルドリン: 6.73 min, DTTB: 6.91 min）とよく一致した。このことから、異なるカラムによる確認試験も選択肢として利用可能であることが示唆された。

以上のことから、GC/MSでの分析よりも感度の面で不利はあるものの、HPLC/PDAも代替分析法として利用可能であると考えられた。

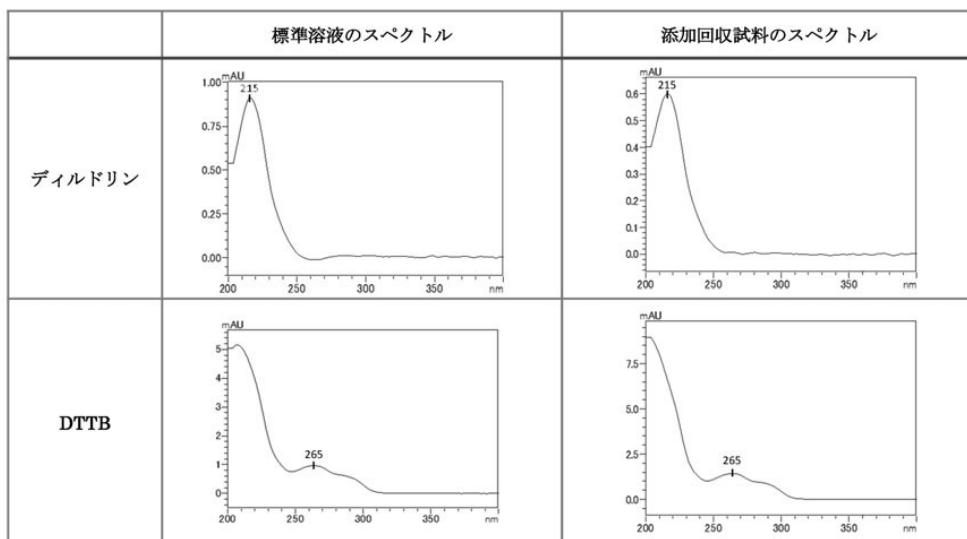
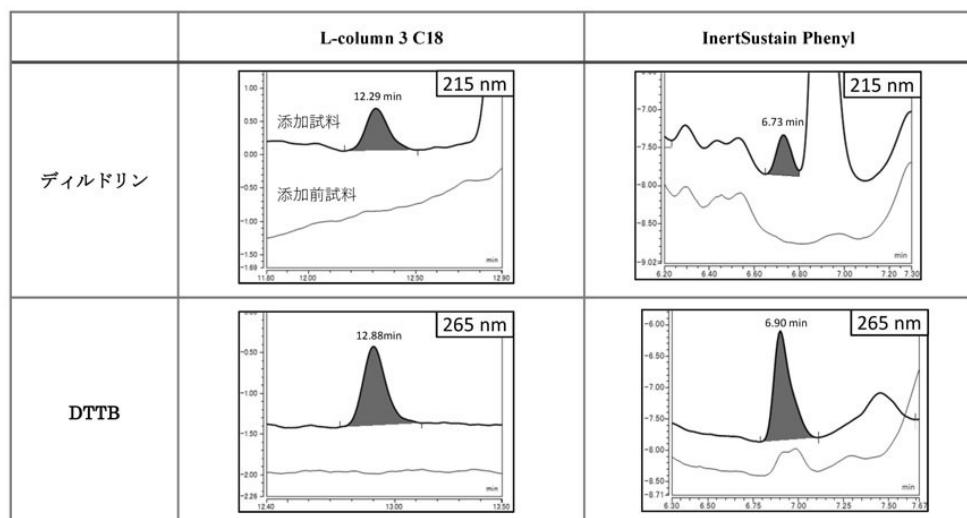


図11 標準溶液と添加回収試料におけるUVスペクトルの比較

図12 異なるカラムにおける添加回収試料のクロマトグラムの比較  
(いずれも上が $30 \mu\text{g/g}$ 添加試料、下が添加前試料)

## まとめ

本研究では、我々が先行研究で開発した纖維製品中の防虫加工剤改正分析法について、昨今のヘリウム不足に対応するため、水素キャリアガス-GC/MS及びHPLC/PDAを用いた分析法の検討を行った。その結果、いずれも感度の面でヘリウムキャリアガス-GC/MSに劣るもの、現行基準値である $30 \mu\text{g/g}$ を下回る定量下限値が得られることがわかった。本研究の結果から、水素キャリアガス-GC/MS及びHPLC/PDAは代替分析法として利用可能であると考えられた。

## 謝辞

本研究は厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）「H29-化学-指定-002」にて実施しました。

## 参考文献

- 西以和貴、佐藤学、仲野富美、辻清美、上村仁、河上

強志：纖維製品中のディルドリン及びDTTB分析法の開発、YAKUGAKU ZASSHI, 140, 809-818 (2020)

- 一般社団法人日本物理学会：声明「ヘリウムリサイクル社会を目指して」<https://www.jps.or.jp/info/formation/docs/seimei20191220.pdf> (2020/4/21 アクセス)
- 代島茂樹：水素キャリヤーガスによるGC/MS分析の基礎 2013.2.22 GC研究懇談会 [http://www.jsac.or.jp/group/GC/doc\\_files/323GCMScarriergas.pdf](http://www.jsac.or.jp/group/GC/doc_files/323GCMScarriergas.pdf) (2020/4/21 アクセス)
- 三好保、石川英樹、藤井正信、黒田弘之：高速液体クロマトグラフィーによる羊毛纖維製品中の防虫加工剤 4, 6 - ジクロロ - 7 - (2, 4, 5 - トリクロロフェノキシ) - 2 - トリフルオロメチルベンゾイミダゾール (DTTB) の定量法、日本衛生学雑誌, 39(3), 640-646(1984)

## 資料

### 神奈川県における腸管出血性大腸菌の検出状況（令和元年度）

古川一郎，政岡智佳，中嶋直樹

### Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April,2019-March,2020)

Ichiro FURUKAWA, Tomoka MASAOKA  
and Naoki NAKAJIMA

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: 以下, EHECと略す) 感染症は、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」(平成10年10月2日法律第114号)で三類感染症に分類され届出が必要となる<sup>1)</sup>。患者あるいは保菌者から分離された菌株はそれぞれの地方衛生研究所(以下、地研と略す)に集められ、生化学的性状、血清型、毒素型等を確認したのち、地研は「病原性大腸菌O-157の検体提供依頼について」(平成8年6月19日付、衛食第160号)および「飲食店における腸管出血性大腸菌食中毒対策について」

(平成19年5月14日付、食安監発第0514001)に基づき、国立感染症研究所(以下、感染研と略す)細菌第一部に菌株を送付している。さらに、溶血性尿毒症症候群(以下、HUSと略す)発症者については、EHECが分離されなくても、便からのベロ毒素(以下、VTと略す)の検出、血清中のO抗原凝集抗体あるいはVT抗体の検出によってEHEC感染症と診断された場合も届出の対象となつており<sup>1)</sup>、当所においても搬入された血清について、EHEC加熱死菌によりO抗原凝集抗体の確認を行っている。

EHECの広域的な感染事例を迅速に探知するため「腸管出血性大腸菌による広域的な感染症・食中毒に関する調査について」(平成30年6月29日付事務連絡、厚生労働省健康局結核感染症課、厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課)に従い、各症例の疫学的な情報と菌株の遺伝子解析の結果について国および自治体が情報共有することになった。感染研では遺伝子解析の手法として、パルスフィールド・ゲル電気泳動(以下、PFGEと略す)に代わり、EHECの主要な血清型であるO157、O26およびO111についてMultilocus variable-number tandem-repeat analysis(以下、MLVAと略す)を用いた解析法が平成26年度から導入された。現在は、O103、O121、O145、O165およびO91を加えた合計8つの血清型について実施されている。

当所では、神奈川県域(横浜市、川崎市、相模原市および横須賀市を除く神奈川県内、以下、県域と略す)から集まったEHECについて血清型別、VT型別、薬剤感受性試験およびPFGE法を実施している。さらに、血清型がO157、O26およびO111の株については、MLVA法

表1 EHEC 37株の血清型およびVero毒素型(令和元年度)

管轄施設	菌株数	O157		O26	O91	O103	O111	OUT
		VT1&2	VT2					
平塚保健福祉事務所	2	1		1				
同上 秦野センター	4	3						1
鎌倉保健福祉事務所	2	2						
同上 三崎センター	2	2						
小田原保健福祉事務所	4	2	1		1			
同上 足柄上センター	2	1	1					
厚木保健福祉事務所	4	3		1		1		
同上 大和センター	3		1			2		
茅ヶ崎市保健所	3		1				1	1
藤沢市保健所	11	6	4					1
計 (割合)	37	20 (54.1%)	8 (21.6%)	2 (5.4%)	1 (2.7%)	2 (5.4%)	2 (5.4%)	2 (5.4%)

表2 年齢層別・性別によるEHEC感染症患者及び保菌者の数

年齢層	男性	女性	計
0 - 5	6	3	9
6-10	1		1
11-20	1	1	2
21-30	3	5	8
31-40	1	4	5
41-50	2	3	5
51-60		1	1
61-70		1	1
>70	2	4	6
計	16	22	38
年齢平均値	25.8	38.2	33.0
年齢中央値	22.0	33.0	29.0

を用いた遺伝子解析を併せて実施している。本報では、令和元年度に収集したEHEC 37株の遺伝子解析および薬剤感受性試験の結果について報告する。

当所微生物部に搬入されたEHEC 37株の内訳は、すべてヒト由来であり、35株は県域の医療機関等で分離され、2株は当所地域調査部において患者家族および接

触者の検便から分離された。菌株の他にHUS患者の血清1検体が搬入され、O157の血清抗体が確認された。表1には管轄施設別の搬入菌株数、EHECの血清型、毒素型および分離株数を示した。37株の血清型およびVT型は、O157(VT1&2) 20株、O157(VT2) 8株、O26(VT1) 2株、O103(VT1) 2株、O111(VT1) 2株、O91(VT1) 1株、OUT(VT1) 2株であった。

EHECが分離されず血清で診断された患者1名を含め、EHEC感染症と診断された患者および保菌者38名の性別と年齢構成は、男性が16名、年齢範囲1～84歳で平均25.8歳（中央値22.0歳）、女性が22名、年齢範囲3～87歳で平均38.2歳（中央値33.0歳）であった（表2）。

PFGEは、制限酵素Xba Iを使用し、6V/cm、パルスタイム2.2～54.2秒、12°Cの条件下で19時間行った。泳動パターンについてBioNumerics（Applied Maths社）を用いてクラスター解析し、デンドログラムを作成した。O157、O26およびO111についてはMLVAを併せて行い、方法は腸管出血性大腸菌MLVAハンドブックO157、O26、O111編（地研協議会保健情報疫学部会マニュアル作成ワーキンググループ編）に従って実施した。O157(VT1&2)20株およびO157(VT2)について、PFGEの結果を基にデンドログラムを作成し、PFGEパターンが一致した場合は1つのgroupとして図中に示した（図1、2）。また、MLVA法の結果についてはパターンごとに記号で

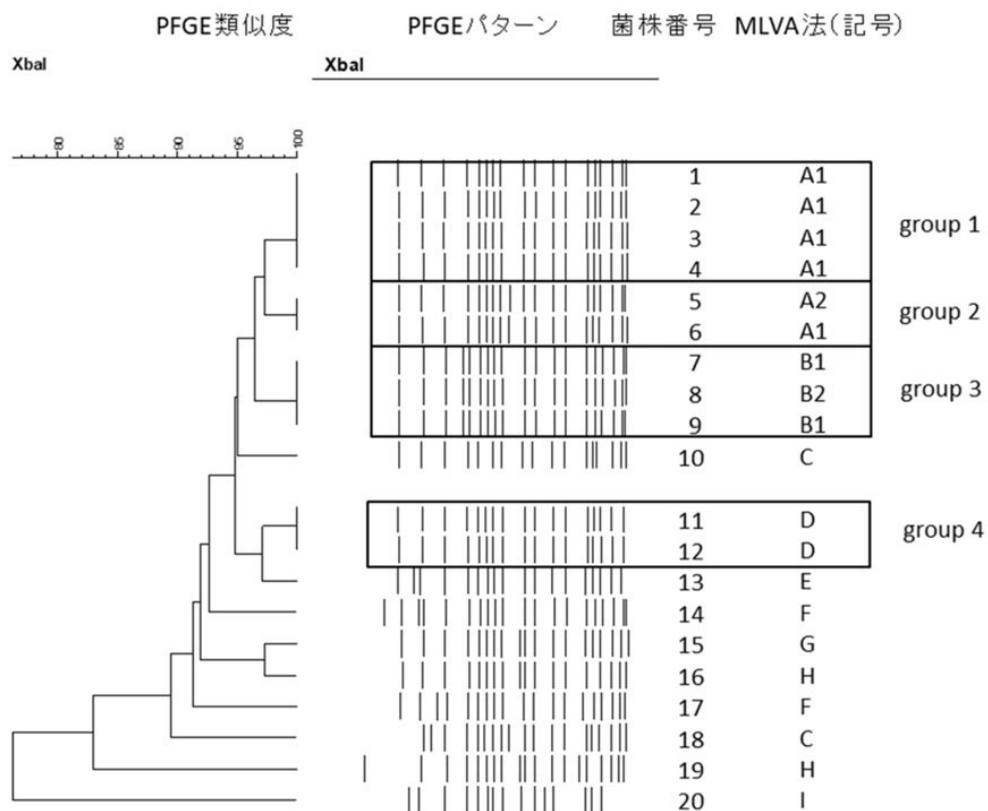


図1 EHEC O157 VT1&amp;2 (20株) の遺伝子解析結果

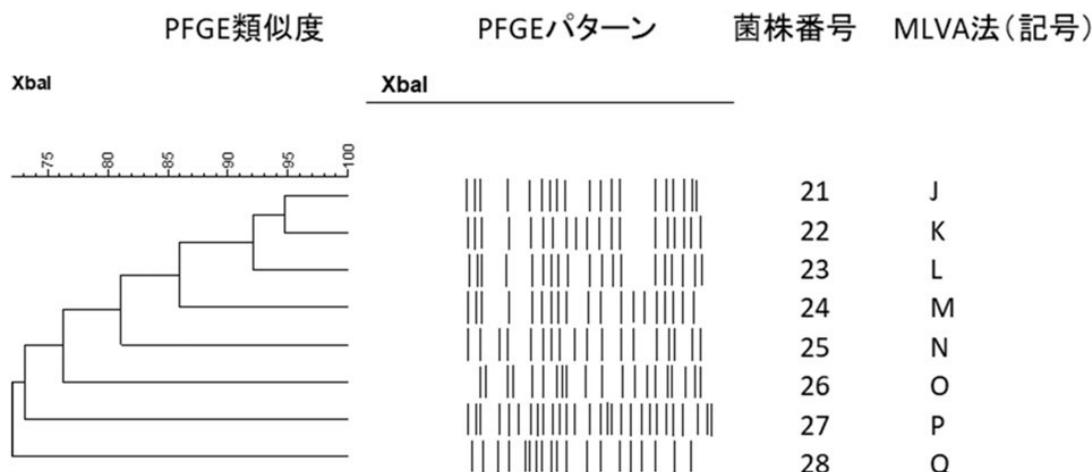


図2 EHEC O157 VT2 (8 株) の遺伝子解析結果

表3 EHEC 37株の薬剤感受性試験結果

判 定	薬剤の数とその内訳※		血清型	菌株数
耐 性	3剤	KM, SM, TC	OUT VT1	1
	2剤	SM, TC	O91 VT1	1
	単剤	SM	O157 VT1&2	3
感受性				32
計				37

表記した。

O157(VT1&2) 20株の遺伝子解析の結果、group 1および2に含まれる6株は神奈川県内の保育施設における同一集団事例の分離株であり、PFGEはバンド1本違いの2パターンに、MLVAは菌株No.5のみが17箇所のうちの1か所違いでパターンが分かれたものの、いずれの方法においても菌株間の類似度は高い結果を示した。group 3およびgroup 4はそれぞれが同一家族内の分離株であり、MLVAの結果はgroup 3の菌株No.8が17箇所のうちの1か所違いになった他は各々のグループ内においてパターンは一致していた。

O157(VT2) 8株については同一家族内の分離株2株を含んでいたが、PFGEおよびMLVAによる遺伝子解析の結果、いずれの菌株も遺伝子パターンは一致しなかった。

O157以外の血清型についてはすべて散発的な分離株と思われ、MLVAあるいはPFGEにおいてパターンが一致した菌株は確認されなかった。

次に、EHEC 37株について、CLSI（米国臨床検査標準化協会）法<sup>2)</sup>に準拠して薬剤感受性試験を実施した。

12薬剤〔アミノベンジルペニシリン(ABPC)、セフォタキシム(CTX)、クロラムフェニコール(CP)、ホスホマイシン(FOM)、ゲンタマイシン(GM)、カナマイシン(KM)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、ノルフロキサシン(NFLX)、ストレプトマイシン(SM)、スルファメトキサゾール・トリメトブリム合剤(ST)およびテトラサイクリン(TC)〕を用い、試験の結果は薬剤ごとの阻止円の基準に従い、耐性・感受性に分けて判定した(表3)。いずれかの薬剤に耐性を示したのは5株で、このうちSMに単剤耐性であった菌株No.14、No.15およびNo.17のO157(VT1&2) 3株は、PFGEおよびMLVAのいずれの方法においても遺伝子型は異なっていた。保育施設における集団事例の分離株であるO157(VT1&2)の6株は、今回用いたすべての薬剤に感受性を示した。搬入されたEHECについては、例年と同様に耐性菌の割合は低い傾向が認められた。

令和元年度は37株のEHECが搬入され、前年度の111株と比較して大きく減少した。しかしながら、平成29年度および30年度に続いて保育施設における集団事例が確認された。今後感染症の発生抑制や感染拡大防止の

ために、児童やその家族に対する啓発あるいは保育施設における日頃の感染症対策が一層求められると考える。

なお、この報告の一部は、厚生労働科学研究費補助金（食品由来感染症の病原体情報の解析及び共有化システムの構築に関する研究）によって実施した。

最後に、ご協力を頂きました各医療機関、医療検査機関、衛生研究所地域調査部および菌株搬入にご尽力いただきました各保健福祉事務所、生活衛生課、健康危機管理課、藤沢市保健所ならびに茅ヶ崎市保健所の方々に深謝いたします。

### 文献

- 1) 腸管出血性大腸菌感染症：病原微生物検出情報, 27, 149(2006)
- 2) Clinical and laboratory standards institute; methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline, CLSI document M45-A1, Wayne, Pa., (2007)

## 資料

### 神奈川県域における インフルエンザウイルスの 検出状況（2019/2020シーズン）

渡邊寿美，近藤真規子，佐野貴子，  
稲田貴嗣，櫻木淳一

### Surveillance of influenza virus in Kanagawa Prefecture (2019/2020 season)

Sumi WATANABE, Makiko KONDO,  
Takako SANO, Takatsugu INADA  
and Junichi SAKURAGI

当所では、神奈川県域（横浜市、川崎市、相模原市および横須賀市を除く神奈川県内、以下県域）における季節性インフルエンザ（AH1pdm09, AH3, B）の動向を把握するため、通年で季節性インフルエンザ調査を行っている。また、鳥インフルエンザ（AH5, AH7等）のヒト感染事例が報告されている地域からの帰国者等、

鳥インフルエンザ感染が疑われる患者に対しては、季節性インフルエンザの他に鳥インフルエンザのAH5とAH7も組み込んだ病原体検査対応を行っている。本報では、2019/2020シーズン（以下本シーズン）におけるインフルエンザウイルスの検出状況を報告する。

ウイルス調査は、2019年9月～2020年3月の間にウイルスサーベイランス（県域の病原体定点調査）279例、入院サーベイランス（県域のインフルエンザと診断された入院症例）9例、集団かぜ調査（県域各保健福祉事務所およびセンター、藤沢市、茅ヶ崎市の初発事例）10集団43例、一般依頼検査（藤沢市と茅ヶ崎市からの依頼検査）68例、計399例の患者検体（鼻腔ぬぐい液、咽頭ぬぐい液、うがい液）を対象に行った。このうち、ウイルスサーベイランス279例、入院サーベイランス9例、集団かぜ43例、計331例についてMDCK細胞を用いてインフルエンザウイルス分離検査を行った。2代の継代培養を経ても細胞変性効果が見られなかった場合は分離陰性と判定した。分離株（228株）は、標準抗血清（国立感染症研究所配付）とモルモット血球を用いた血球凝集抑制試験（HI試験）を実施し、AH1pdm09, AH3, Bビクトリア系統、B山形系統に型別した。HI試験に必要なHA価が得られずにHI試験が実施できなかった分離株および標準抗血清との反応が悪くて型別できなかった分離株については、HA遺伝子を検出対象としたリアルタイムRT-PCR法を用いて型別した。一般依頼検体68例とウイルス分離陰性検体103例、計171例については、リアルタイムRT-PCR法を用いてインフルエンザウイルスの検出と型別を行った。さらに、AH1pdm09分離株に

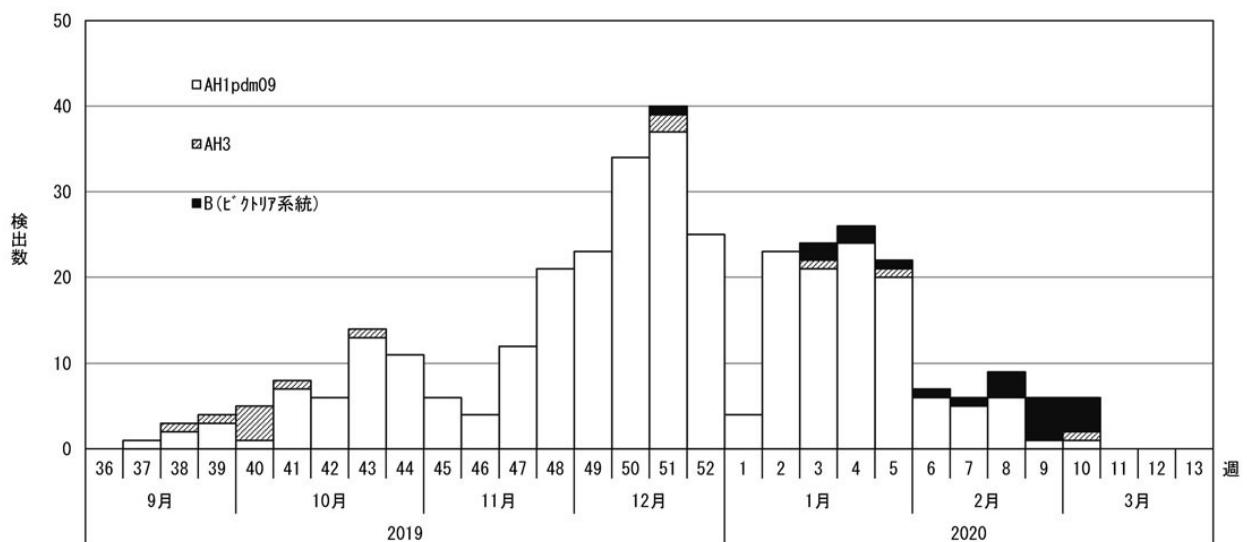
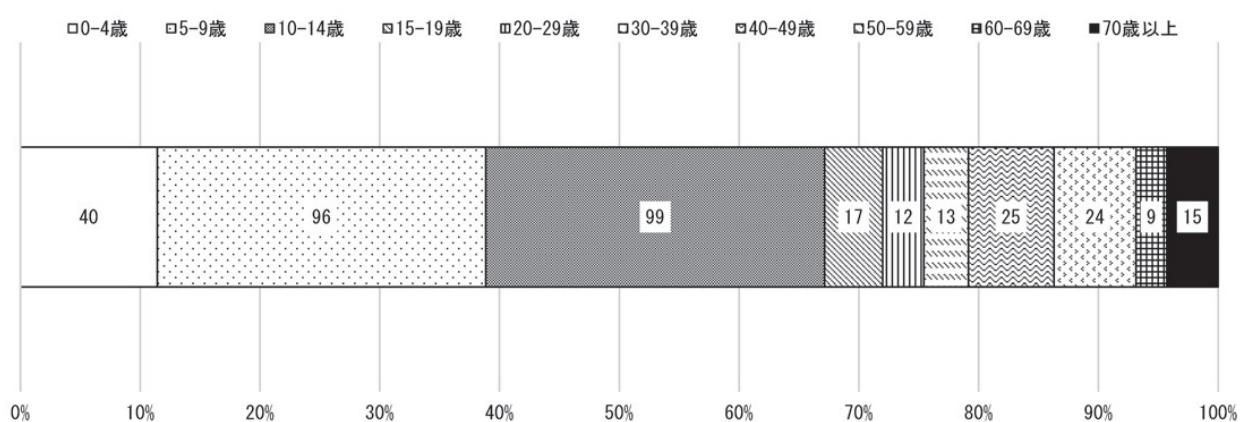


図1 インフルエンザウイルス検出数

表1 入院症例からのインフルエンザウイルス検出状況

症例	検体採取週	年齢	症状	検出 インフルエンザウイルス
1	2019年	49 81歳	発熱（最高37.5°C）、上気道炎、気管支喘息増悪、体動困難	AH1pdm09
2		51 85歳	発熱	AH1pdm09
3		52 73歳	発熱（最高39°C）	AH1pdm09
4	2020年	2 71歳	発熱（最高38.8°C）	AH1pdm09
5		2 99歳	発熱（最高37.9°C）	AH1pdm09
6		3 4歳	腎機能障害	AH1pdm09
7		3 85歳	発熱（最高38°C）、腎機能障害	AH1pdm09
8		4 57歳	発熱（最高38.3°C）、筋肉痛	不検出
9		4 90歳	発熱（最高38.7°C）、SpO <sub>2</sub> 低下	AH1pdm09



図中数字は検出数 N=350

図2 インフルエンザウイルス検出者の年齢構成

については、NA（ノイラミニダーゼ）遺伝子のオセルタミビル耐性マーカー（H275Y変異）を調査した。

インフルエンザウイルス検出数を図1に示した。2019年9月にAH1pdm09が6例、AH3が2例、10月にはAH1pdm09が36例、AH3が6例検出された。11月中旬以降に検体数が増えてくると、AH1pdm09の検出が続き、本シーズンはAH1pdm09を中心とした流行になった。検出されたインフルエンザウイルスは350例で、その内訳は、AH1pdm09が317例（90.6%）で最も多く、Bピクトリア系統が20例（5.7%）、AH3が13例（3.7%）であった。B山形系統は検出されなかった。

集団かぜ調査においては、9～12月にかけて検査依頼があった。9月の1集団からAH1pdm09、10月の4集団のうち3集団からAH1pdm09、1集団からAH3、11月の2集団からAH1pdm09、12月の3集団からAH1pdm09が検出され、図1のウイルス検出数の推移を反映した結果となった。

入院症例のインフルエンザウイルス検出状況を表1に示した。各症例は流行期（定点あたりの患者報告数）

1.0人/週を超えていた<sup>1)</sup>の入院事例であり、8例からAH1pdm09が検出された。1例はインフルエンザウイルス不検出であった。年齢構成別では、70歳以上の高齢者が7症例、60歳以下の成人が1例、小児（14歳以下）が1例であり、高齢者が多かった。

AH1pdm09分離株についてNA遺伝子のオセルタミビル耐性マーカーを調査したところ、197株中3株（1.5%）の耐性株を検出した。これらの株は、ウイルスサーベイランスで採取された検体からの分離であり、薬剤治療開始は検体採取当日となっているため、治療過程において耐性を獲得したとは考えられなかった。また、それぞれの検体採取日が2週間以上離れていることから、直接の伝播はないと考えられ、耐性株が市内で伝播している可能性が示唆された。

インフルエンザウイルス検出数は、399例中350例（87.7%）であり、その年齢構成は、10～14歳が最も多く99例（28.3%）、次いで5～9歳が96例（27.4%）、0～4歳が40例（11.4%）となっており、小児が67.1%を占めた。他の年齢群は10%未満（2.6～7.1%）であつ

た。（図2）

最後になりましたが、検体採取および患者情報の収集にご協力いただきました医療機関の先生方および検体搬送にご尽力いただきました保健所職員の皆様に深謝いたします。

#### 文献

- 1) 神奈川県感染症情報センター：神奈川県感染症発生情報（2019年36週報～2020年13週報）

## 資料

### 食品中の二酸化硫黄及び亜硫酸塩類分析法の検討及び適用試験結果

酒井康宏, 西みゆき, 粟野由梨佳\*, 上原基浩,  
佐藤久美子, 脇ますみ, 相川勝弘

### Verification study of analytical method for sulfur dioxide and sulfites in foods

Yasuhiro SAKAI, Miyuki NISHI, Yurika AWANO,  
Motohiro UEHARA, Kumiko SATO,  
Masumi WAKI, Katsuhiro AIKAWA

令和元年6月に改正された「第2版食品中の食品添加物分析法」にて二酸化硫黄及び亜硫酸塩類の試験法が一部変更され、液体クロマトグラフィー(以下HPLC)による二酸化硫黄及び亜硫酸塩類確認分析法が参考として(以下参考法)追加された<sup>1)</sup>。参考法では試料調製に使用する蒸留捕集液に1%トリエタノールアミン溶液(以下1%TEA), 二酸化硫黄及び亜硫酸塩類試験法の比色法(以下比色法)では蒸留捕集液に0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を用いるとされている等、参考法と比色法の試料調製において異なる操作がある。そのため、比色法において二酸化硫黄を定量し、参考法による確認を行う場合、再度試料調製が必要となる。しかし、比色法の試料調製で得られた試験溶液を、ピークの保持時間の確認や夾雑成分の分離が可能なHPLC測定に用いることができれば、再度試料調製をせずに特異性の高い確認をすることが可能となり、より迅速な検査につながる。そこで、HPLC測定にも使用できる試験溶液を比色法の試料調製で得ることを目的として、蒸留捕集液の種類について検討を行い、更に適用試験を実施した。

比色法の蒸留捕集液は0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液であるため、強塩基性の試験溶液をHPLC測定に用いることで、装置部材の劣化、塩の析出等の影響が生じると懸念された。そこで、比色法の注に参考法で使用する

1%TEAを使用してもよいと示されている<sup>1)</sup>ことから、比色法の蒸留捕集液に1%TEAを用いて試験を行い、0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を用いた場合と結果を比較した。試料にはグラニュー糖を用い、試料調製は図1、比色による定量操作は図2に従って実施した。添加回収は、グラニュー糖2 gに二酸化硫黄標準溶液(100 μg/mL)を0.3 mL添加して実施した(試料中濃度として0.015 g/kg)。使用した標準溶液及び試液は、比色法及び参考法に従い調製した。比色法の蒸留捕集液に0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を用いた時の添加回収率は85.4%, 1%TEAを用いた時の添加回収率は84.2%であった。次に、比色法の蒸留捕集液に1%TEAを用いた時の試験溶液を、参考法のHPLC条件で測定できるかを確認した。試料調製を図1に従って改めて実施し、得られた試験溶液について比色による定量操作を図2、

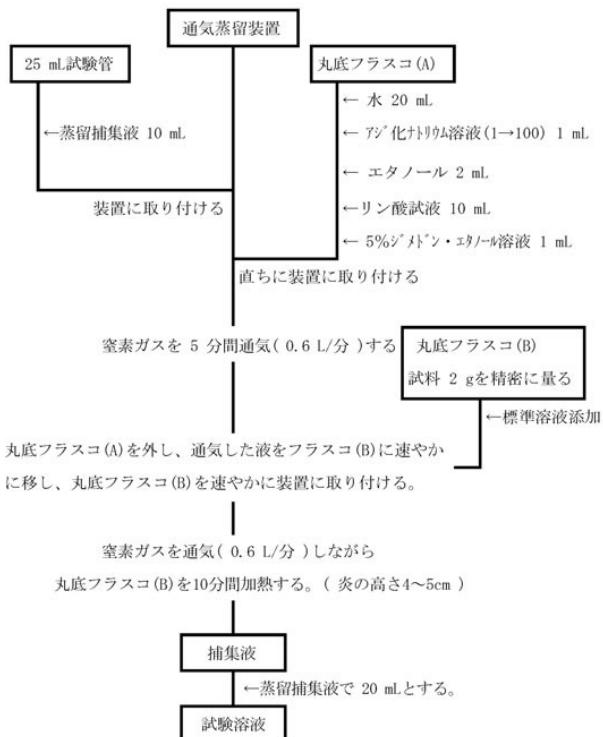


図1 試料調製



図2 比色による定量

表1 HPLC測定条件

カラム : Dionex IonPac AS12A (5 $\mu\text{m}$ , 4.0×200 mm, Thermo Fisher Scientific製)
ガードカラム : Dionex IonPac AG12A (5 $\mu\text{m}$ , 4.0×50 mm, Thermo Fisher Scientific製)
カラム温度 : 40 °C
移動相 : 1.8 mmol/L 炭酸ナトリウム・1.2 mmol/L炭酸水素ナトリウム溶液
流速 : 1.5 mL/分
検出器 : フォトダイオードアレイ検出器
測定波長 : 210 nm
注入量 : 50 $\mu\text{L}$

表2 今回適用したSOP作成ガイドラインの判定基準

真度 (基準値添加)	精度濃度(0.1 $\mu\text{g/g}$ ) <sup>*1</sup>		定量限界	その他 (特異性等)
	併行精度	室内精度		
70~120%	RSD%<10	RSD%<15	マトリックスの影響を 受けずに定量できる	分析対象物質を正確に 識別できる

\*1 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価実施マニュアルを参考に実施した

表3 適用試験の結果

真度 (%)	精度		定量限界 <sup>*1</sup>		特異性
	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)	(B/A) または SN比	添加濃度に 対する割合 (%)	
定量法	89.3	3.31	3.84	17	妨害する発色無
確認法	89.3	1.66	1.96	44	妨害ピーク無

\*1 定量法は0.004 g/kg(2 g採取)、確認法は0.003 g/kg(2 g採取)

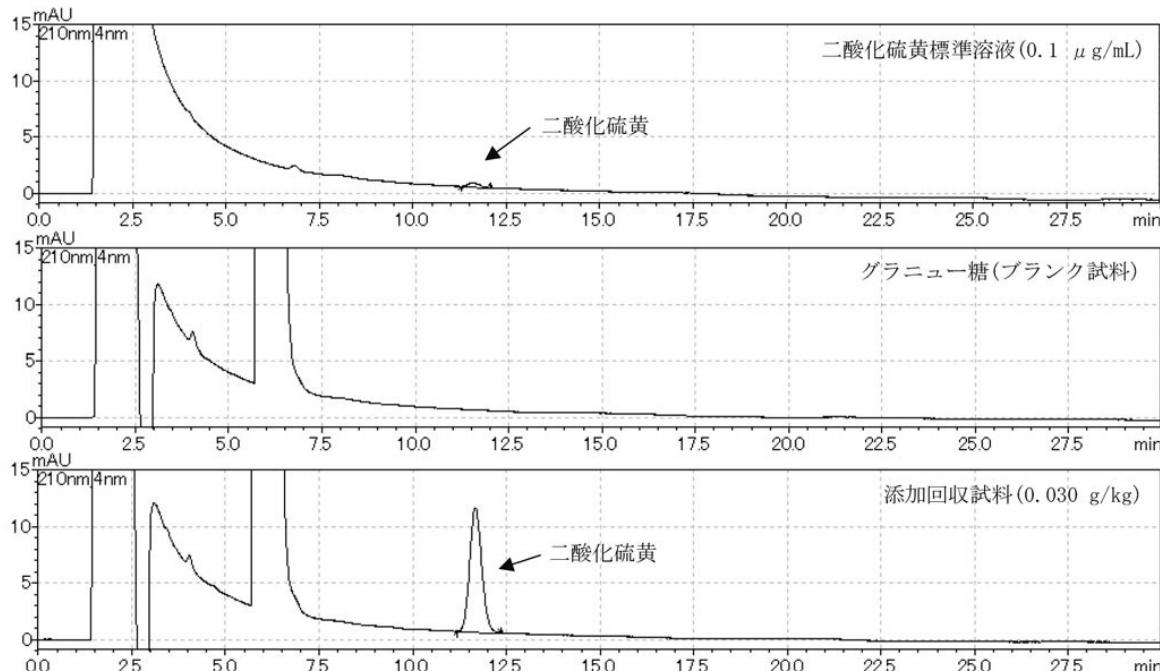


図3 クロマトグラム

HPLC測定を表1の条件に従い実施した。蒸留捕集液に1%TEAを用いた時、比色による定量の添加回収率は87.0%，HPLC測定の添加回収率は84.0%であった。これら検討の結果より、蒸留捕集液に1%TEAを用いて得られた試験溶液は、比色による定量及びHPLC測定による確認のいずれにも用いることが可能と考えられた。

そこで、図1に従い1%TEAを用いて試験溶液を調製した後、図2に従い比色する方法を定量法、表1の条件でHPLC測定する方法を確認法とし、適用試験を行った。適用試験は当所の検査実施標準作業書(SOP)作成ガイドライン理化学編に基づき実施し、表2に示した基準により適否を判断した。分析者3名がそれぞれ試料2検体を2日間分析する計画とした。その他食品の基準値濃度(0.030 g/kg)となるよう、グラニュー糖2 gに二酸化硫黄標準溶液(600 μg/mL)を0.1 mL添加して実施し(以下添加回収試料)、真度、併行精度及び室内精度を確認した。また、定量限界の確認には、蒸留操作後の捕集液に、試験溶液で定量下限値相当(定量法：比色法に準じ0.004 g/kg、確認法：参考法に準じ0.003 g/kg、共に2 g採取<sup>1)</sup>の二酸化硫黄濃度となるよう、標準溶液を添加したもの(以下スパイク試料)を用いた。試験の結果、真度、精度、定量限界及び特異性は表3のとおりであった。真度について確認したところ、平均回収率は定量法

と確認法共に89.3%であり、いずれも判定基準の70～120%の範囲内であった。精度を確認したところ、定量法は併行精度(RSD)が3.31%，室内精度(RSD)が3.84%であり、確認法は併行精度(RSD)が1.66%，室内精度(RSD)が1.96%であった。いずれも併行精度(RSD%)<10，室内精度(RSD%)<15であった。定量限界の確認としてスパイク試料を測定した結果、定量法はグラニュー糖の吸光度(A)に対するスパイク試料の吸光度(B)の比(B/A)が17、定量値の添加濃度に対する割合が95.5%，確認法はSN比が44、定量値の添加濃度に対する割合が98.6%であり、どちらも定量下限値濃度をマトリックスの影響を受けずに定量できた。その他、定量法において定量を妨害するような発色は見られず、確認法において二酸化硫黄標準溶液(0.1 μg/mL)、グラニュー糖(プランク試料)及び添加回収試料(0.030 g/kg)に検出及び定量を妨害するピークは見られなかった(図3)。

今回の適用試験の結果から、蒸留捕集液に1%TEA溶液を用いた試験溶液は比色による定量及びHPLC測定による確認に適用可能であることが確認された。

#### 文献

- 1) 「食品中の食品添加物分析法」の改正について、薬生食基発0628第1号、薬生食監発0628第1号、令和元年6月28日。

## 緊急寄稿

# トピックを通じて知る 新型コロナウイルス

櫻木淳一

Knowledge of novel coronavirus from  
current topics.

Jun-ichi SAKURAGI

これまでの人生の大半をイエローチップと過ごしてきた根っからの実験屋ですが、縁あって昨年4月から公衆衛生分野にこっそり足を踏み入れさせていただいています。サイエンス的思考にはそれなりに慣れがあると自負していますが、この分野に関しては素人に毛が生えた程度の実績しか有りませんし、その毛も頼りないものです。

そうは言っても昨年末から世界を揺るがしているコロナウイルス禍には、現場担当として否応なしに対応に勤しんでおり、いろいろと考えさせられる時もあります。新型コロナウイルスに関する報道を見ていると玉石混淆というか、カオスとでも表現したい状況です。そもそもストレートな科学的言説さえも少なからず不本意な取り上げられ方をしており、何が正しいのか判らないという方も多いと思われます。身も蓋もなく言えば科学の原則論からするとどんな学説も100%仮説であって、正しいと言い切れるものはありません。しかし一方で今回は明らかに間違っていると言えそうな代物が目立ち、影響力の強い媒体に載ることで正されることなく歪んだ認識が広がっている悪例も散見されます。ここではコロナウイルスの基本情報と、これまでに注目されたいいくつかのトピックを紹介して、いち科学者の立場からなるべく冷静に批評してみたいと思います。

## 1. コロナウイルスの基礎知識

コロナウイルスはゲノムに一本鎖(+)側RNAを持つRNAウイルスです。ウイルス粒子(ビリオン)は直径100nmの球形で、ウイルスとしては平均的な大きさです。エンベロープ型ウイルスで、宿主細胞由来の脂質二

神奈川県衛生研究所 微生物部

〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1

重膜をビリオン最外層に纏い、その膜にウイルス由來の外被糖タンパクであるSタンパクがびっしり刺さっています(図1)。電子顕微鏡でビリオンを見るとSタンパクが球を冠状に取り巻いていて、太陽のコロナに見えるためコロナウイルスと命名されています<sup>1, 2)</sup>。

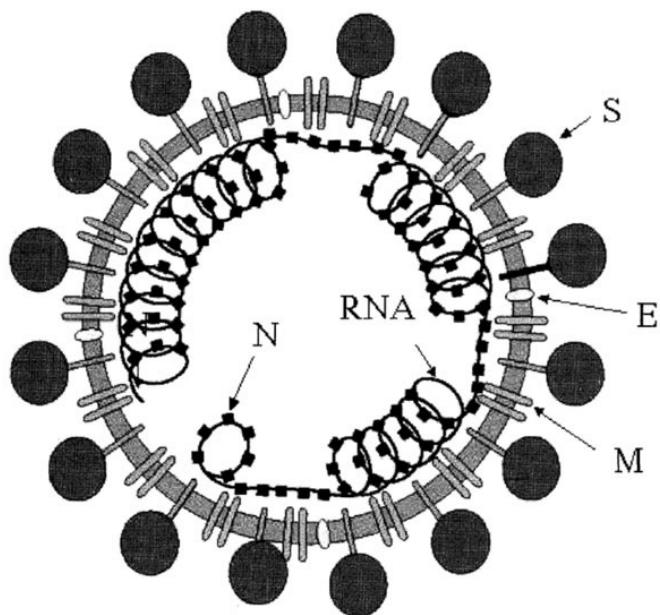


図1 コロナウイルス粒子の模式図

コロナウイルスのエンベロープにはS(spike)蛋白・M(membrane)蛋白・E(envelope)蛋白が存在し、その内部には約30kbの(+)鎖ゲノムRNAとそれに結合するN(nucleocapsid)蛋白が螺旋状の構造をなす。文献2図1より引用。

コロナウイルスの大きな特徴はゲノムの大きさです。ゲノムRNA長は約30000塩基もあり、RNAウイルスとして最長です(ポリオ、ノロは7500、インフルエンザは8分節合計18000)。このゲノム上にRNA依存性RNAポリメラーゼやタンパク切断酵素(プロテアーゼ)、粒子構成タンパク(M, E, N, Sなど)と機能が不明確な小さいタンパク質が複数コードされており、ゲノムから転写されたマイナス鎖RNAを鋳型とした10種類程度の様々な長さのmRNAから翻訳されます<sup>3)</sup>(図2)。

一般にRNAウイルスは複製過程で変異が起きやすいのですが、コロナウイルスの遺伝子産物にはRNAポリメラーゼに校正機能を付与するものがあり、長大なRNAゲノムの複製時にもかなり正確な複製を行うことができます<sup>4)</sup>。Sタンパクは感染宿主の表面抗原と特異的に結合し、ウイルス感染過程が開始されます。結合する表面抗原はレセプター(受容体)と呼ばれウイルスによって異なり、感染後の病態を規定する一要素となります。レセプターに結合したウイルスは主に細胞のエンドサイトーシスによって細胞内小胞に取りこまれ、そこで膜融

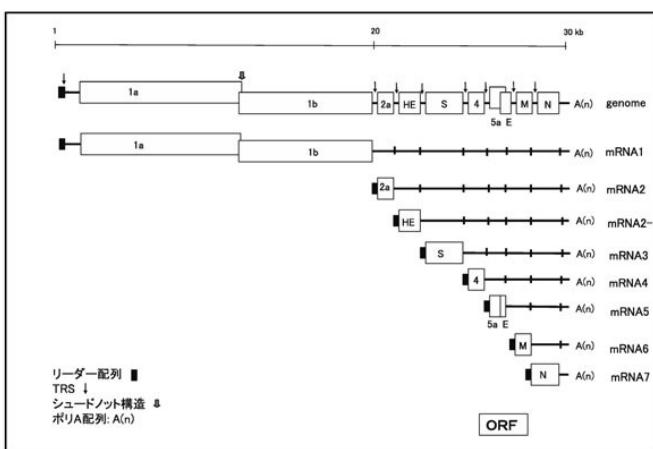


図2 コロナウイルスの遺伝子と、mRNAの種類。文献3図1より引用。

合を起こしてウイルス内部の酵素やRNAゲノムを細胞質内に侵入させ（図3）、複製並びに転写翻訳が行われます。<sup>5)</sup>

発現したウイルス蛋白は集合してゲノムRNAを取りこみつつ粒子形成を行い、細胞から出芽して次の標的に感染する過程を繰り返します。増殖過程で細胞の破壊や過剰な免疫反応などが惹起され、宿主の生物学的平衡が壊されることで発病すると考えられます。

獣医領域ではコロナウイルスは重要な疾患であり、ネコやイヌコロナウイルスは死亡率の高い腹膜炎を引き起こしますし、豚コロナは胃腸炎や下痢の原因で産業的に大きい損害をもたらします。マウスコロナは肝炎の原因で伝染性が強く、実験動物施設にとっては発生したら施

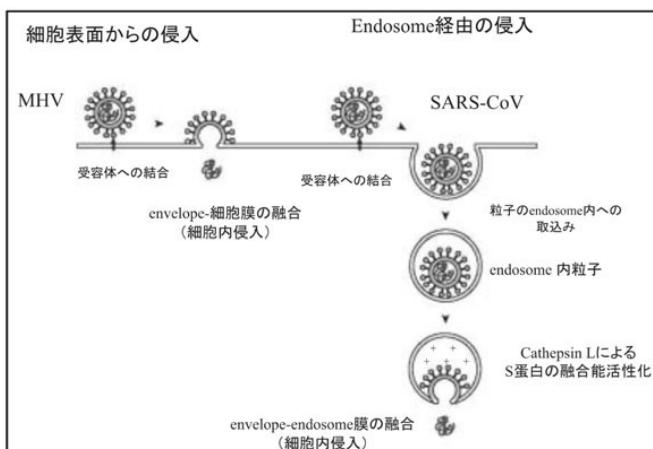


図3 コロナウイルス(マウス肝炎ウイルス：MHVと、SARSコロナウイルス)の細胞侵入経路。

MHVは受容体CEACAM1に結合後、細胞表面から細胞内へと侵入する。一方、SARS-CoVはACE2に結合しendosomeに輸送され、酸性環境下で活性のあるプロテアーゼCathepsinLによりS蛋白の解説及び細胞融合活性が誘導され、endosomeから細胞質内へ侵入する。文献5図2より引用。

設内動物を全処分して完全除染しなければいけない厄介者です。それに対してこれまでヒトコロナは6種類同定されていますが4種類は日常的に感染する風邪の原因ウイルスで、研究されていません。新興感染症である二つはSARS（重症急性呼吸器症候群）ウイルスとMERS（中東呼吸器症候群）ウイルスで、双方致死率の高い重篤な呼吸器疾患を引き起します。しかしSARSは1年あまりの流行後まったく発生がなく、MERSは基本的にラクダからヒトへの一次感染しか起きないので流行が広がらず、どちらも研究が進んでいません。つまりこれまでにコロナウイルスの研究は、大部分が獣医領域で地味に行われていたのが実態でした。

## 2. 新型コロナウイルスについて

2019年11月頃に中国の湖北省武漢市で発生した原因不明の肺炎の流行は瞬く間に全世界に流行を広げ、2009年の新型インフルエンザ以来のパンデミックとなりました。この病原体が新型コロナウイルスであり、SARSウイルスと近縁で病状も同様のためSARS-CoV-2と命名されました。ちなみにこのウイルスによる疾患はCOVID-19と命名されています。致死率はおよそ5%で、飛沫・接触を主とした感染伝播能も相当に高く、世界的な脅威となっています。6月末までのおよそ半年あまりで全世界の感染者は1000万人、死者は50万人を超えています。感染者の2割が重症化すると言われていますが明らかに年齢によるバイアスがあり、致死率は50代以上から急激に高まり80代では15%に及びます。

SARS-CoV-2のレセプターはACE2と呼ばれる膜酵素で、これが発現している上気道や下気道、血管内皮や消化管など広範な細胞が感染標的となり、せき・肺炎や血栓症・下痢など多様な症状を引き起します。また、ウイルス感染により、過剰な免疫反応が惹起されることでサイトカインストームと呼ばれる抗炎症因子の大量分泌が起きて血栓症などの原因になっているとも考えられています。致死率や伝播能からいってこの感染症が直接的に人類の存続を脅かすことはありませんが、経済的・社会的に人類に従来の行動からの転換を強いており、我々は世界の大きな変革を目の当たりにしていると言えそうです。

## 3. どこから来たのか？ 人工物なのか？

SARS-CoV-2がどこから来たのかということについては判っていませんし、おそらくこれからも科学的に確定されることはないでしょう。これまでの新興感染症の例と同様に野生動物から人に伝播したという一般的な説を否定する証拠はありません。ゲノム配列の近縁度を元に

した解析からは、SARSウイルス同様にコウモリ由来であることが強く示唆されています<sup>6)</sup>。しかし当初発生源とされていた中国武漢市の生鮮市場ではコウモリを扱っていなかったという情報もあり、ヒトに感染するまでにウイルスが経由している他の動物の存在が示唆されていました。3月になり類似のウイルスがセンザンコウに感染していることが見いだされ、有力な候補とされています<sup>7)</sup>が、そのウイルスはなおSARS-CoV-2とは遺伝的距離がありますので疑問は残っています。

また、政治的な意図からウイルスの起源については米中の中傷合戦が続いている。お前の研究所から漏れただろう、いやおまえらが持ち込んでばらまいたんだろう、お前らが意図的に作ってたんだろう、と国同士で言い争っています。さらに流行最初期にはウイルスの遺伝子内にエイズウイルス（HIV）の遺伝子配列が入っており、人工ウイルスの証拠であるという論文がインドのグループから投稿されました(<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.30.927871v1>)。この論文は審査前に公表されて世界中のマスコミで報道され、エイズウイルスの発見でノーベル賞を受賞したDr. Luc Montagnierまでが肯定的意見を発したせいで大騒ぎになりました。論文を読めば判ることなのですが、彼らがHIVの配列と指摘しているのはわずか6–7アミノ酸の部位であり、偶然でも十分あり得る上にその配列がタンパク質の機能領域として働いている根拠もありません。単なる偶然をフレーミングして根拠を後付けしていると批判されたこともあり、早々にこの論文は取り下げられました。審査もされていないのでこの論文は無かったことになりました。ちなみにMontagnier博士はノーベル賞受賞後にホメオパシーを肯定したり、ワクチンに否定的な発言をするなどなかなか微妙な方です。ノーベル賞は特定分野の業績に対する栄誉であることに注意しましょう。

#### 4. 閑話

少しここで現在の学術論文の成立について説明しておきます。基本的に自然科学の学術論文は科学者によって執筆されます。論文は学術雑誌に投稿（submit）されたら、まず編集者（Editor）が審査（Peer Review）に回すかを判断します。編集者は商業雑誌であれば研究者ではなく、主として新奇性やインパクトに基づいて論文を取り扱います。審査に回すことにしたら複数（通常2–4名）の審査員（Reviewer）を編集者が選び、審査を依頼します。審査員は論文を理解し評価できると考えられる科学者で、審査は無償ボランティアです。審査で論旨・実験に不備があったり水準に達していないければ不採択（Reject）となりそこで終わり、改善後に掲載可能と

判断されれば修正（Revise）を指示されます。Reviseはしばしば複数回にわたり、基本的には複数審査員が最終的に Reject の判断をしなければ Editor が採択（Accept）を決定し、雑誌に掲載となります。掲載されて初めて、その論文は学術的に存在すると見なされます。

このように論文審査は性善説に基づく美しい科学者間の互助システムとなっているわけですが、この世にブルーオーシャンなんて無いのです。第一発見者が栄誉総取りのWinner-take-allの世界、重要な論文の審査は仁義なき闘闘の場です。Nature, Science, Cellのような上級雑誌の編集者は科学者の生殺与奪権を握っているわけです。投稿された論文によっては、編集者や科学者の人間関係の中で、適切な審査を受けられずに不採択になってしまい、第一発見者の栄誉を横取りされてしまう事例があると耳にします。

そこで最近ネットの利点を活かして発達しているのが、寄託サイトです。皆さんもニュースなどで扱われるmedRxivとかbioRxivという有名詞を見たことはありませんか。これがいわゆる寄託サイトで、xはギリシャ語のカイに見立ててアーカイブ（所蔵庫）と読みます。このサイトは誰もがアクセスでき、所蔵された論文を読んでコメントすることも出来ます。研究者は自分の論文が書き上がったらまずここに寄託し、同時に雑誌に投稿します。するとその時点で発見とその帰属が明らかになりますので、論文の採択時期に関わらず、第一発見者が誰であるかの証拠が記録されることになります。先取権の横取り防止にこれは有効で、設立後一年ほどのサービスですが確かな存在感を發揮しています。しかし大きな弊害も出てきています。それは論文審査前に公開されるので、著者に先行者としてのアドバンテージが減ってしまう点、それとなにより寄託サイトのある論文は審査前なので、信用性は一切担保されていないという点です。これは新型コロナで非常に問題になっていますが、寄託サイトの論文はタダで見られて論文の形をしているので一部のマスコミはセンセーショナルなタイトルに飛びつくんですね。しかしこれらはいわば論文の卵であって、妄想から嘘から重要なから世界を変えるのまで玉石混淆、当然石が大半です。大々的にマスコミに騒がれても、あっさり取り下げられて（Withdrawn）消えてしまう論文も後を絶ちませんが、その顛末までフォローされることなく、報道時点の言説が真実として流通してしまいかがちです。マスコミが真偽の判断をするのは難しいですから、皆さんは気になる学説があったらまず原典に当たつて自己判断を怠らないようにして下さい。

## 5. L型・S型など

3月頃に盛んにマスコミで言われていた学説で、SARS-CoV-2にはL型とS型があり、S型の病原性は弱くアジア型、L型は変異して強毒化した株でヨーロッパで流行している、というものがありました。これは中国のグループが中国の雑誌に載せた論文で<sup>8)</sup>、かなりもつともらしく広まったのですが論文としてはゲノム解析と疫学データを突き合わせて相関を見ているだけで、たまたまウイルス遺伝子の1カ所がLeucineかSerineかというところが目印になった、という内容です。そのアミノ酸が病原性を規定しているというデータは何も無いので、あくまでマーカーとして使えるかも、というだけのことです。実際にその後欧米の研究者から膨大な遺伝子データに基づく包括的解析が行われて有力紙に掲載されています<sup>9)</sup>、それによればウイルス変異株が2系統ではないし、病原性との相関も指摘されていません。状況証拠としてヨーロッパ型とアジア型の株の違いというのは確かにあるようなので、先の論文は否定されたわけではありませんが、重要視するほどの知見ではないというところでは無いかと思われます。

## 6. 日本の謎？ BCGワクチン？

感染が拡大してくるとヨーロッパや米国と比べて、アジアの人口あたり感染死亡者が明らかに少ないことが話題になり、Japanese Paradoxなどと優越感をくすぐる見出しが報道で躍るようになりました。しかし実際は日本だけが死亡率が低いわけではなく、アジア一帯で欧米と比べて桁が少ない死亡率の国が目立つので、日本独特的衛生行動だのでは説明できないのです。これについて、日本の研究者が謎を解き明かした！などと一部マスコミが歓喜した「論文」が一時話題になりました。しかしこれも寄託サイトにあるもので、正式に受理されていないのです(<https://www.cambridge.org/engage/coe/article-details/5eed5ac5f1b696001869033f>)。概要の記事によると既に日本では類似のS型ウイルスが無症候で流行していて、そのあとK型が大流行した。K型とのウイルス干渉で日本ではインフルが流行しなかった。一方武漢では重症になりやすいG型ウイルスが出てきて、これが世界に広がった。ヨーロッパではS型が先に人知れず流れていたので、その抗体が抗体依存性感染増強(AD E)を引き起こして死者が膨大になった、などということです。これだけ読んでもなんだそれは、という感じだったので上記論文原典にあたったのですが、驚くべきことに報道以上の内容がほぼありませんでした。S型やらG型やらのシーケンスデータも無ければ疫学情報も無い、ウイルス干渉やADEの意味もちゃんと判ってない、学

生が書いたネット小説か、というくらいのストーリーで、それも破綻している。G型がGlobalの略なのは良いとしても、S型は先駆け（最初に出たから）のS、K型は欠ける（インフルの流行を欠けさせたから）のKだそうで、ネーミングは非常に安易です。論文の体をなしていませんので気にする価値はありませんが、世の中どんな論文でも受理する雑誌はあるので、いずれデータベースに入ってしまうとは思います。

こんな論外な説はともかく、BCG接種免疫説は結構興味深いです。これまで世界的に結核ワクチンであるBCGの接種がなされていますが、歴史的にまったく接種していない国、していたけれど中止した国、現状継続している国によってCOVID-19による10万人あたりの死者数が大きく異なるというもので、情報がちょっと古いでですがこのサイトに概要が載っています。

<http://blog.knak.jp/2020/05/covid-19bcg4.html>

- 1) BCG全員注射をやったことのない4か国（死者は極めて多い）
- 2) 現在もBCG注射をしている国は、現在はしていない国境を接する隣国に比し、著しく低い。
- 3) BCG全員注射をやったことのない4か国（160人以上）と、現在もやっている残りの国（5人未満）との差は驚くほど大きい。
- 4) ワクチンのうち、ソ連株、日本株を使う国は死亡率が低い。死亡率が高い国はDenmark株が多い。

といった指摘がなされています。論文としては寄託サイトにいくつか投稿されていますが、東京工業大学の仕事では、日本株(Tokyo172-1)を接種している国では感染者が倍になるのに平均7.2日掛かるのに対して、他の株を使っている国では平均5.5日で、統計的有意差もあったとしています(<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.06.20055251v2>)。また、7月に有力雑誌であるPNASにアメリカのグループの論文が掲載されました<sup>10)</sup>。論文は採択されるまでに1-3ヶ月は掛かるので、内容的にはこの説の最初期の報道内容が形になつたものに過ぎません。完全に欧米の国だけを対象にした仕事となっており、死亡率が抜群に低い東アジアの国々のデータは全くなく、また日本礼賛の根拠であるワクチン株の違いについての考察もなされていません。しかしそうした不十分なデータを元にしてもBCG接種の有無によるCOVID-19死亡率には明らかな有意差があることを認めています。不満の大きい論文ではありますが、採択の事実は客観的批判に耐える科学的妥当性が認定されたということで、BCG研究を進める意義は確立されたと思われます。BCGに依る抗COVID-19のメカニズムについてはまだ仮説の域を出ませんが、たまたまの交差反

応説（筆者は無理があると考えます）、自然免疫の増強説（COVID-19だけに効く説明が付かない）などが取り沙汰されています。

## 7. 空気感染？飛沫感染？

基本的にコロナウイルスは飛沫もしくは接触感染であり、SARS-CoV-2についても疫学的データに基づいてその可能性が高いとされ、3密防止等の対策に至ってある程度の効果を上げています。空気感染する疾病は麻疹・水痘（水疱瘡）・結核の3つであり、アウトブレイクが起きると非常にインパクトのある伝播様式になります。麻疹は理論上同じ部屋にいれば空調関係なく感染しうるし、一人の感染者から10–20名に広がります。SARS-CoV-2の伝播は明らかにそれらとは異なると考えられますが、「飛沫感染だから2m離れれば大丈夫」とは言い切れない感染例もあり、「エアロゾル感染」という学術的には無かった造語で説明されたりしています。私見ですが、病原体の感染様式がここまで大量の例で検討されたことはなかったので、飛沫感染が再定義されたという解釈で良いのでは無いかと思っていますし、指摘がなかつただけでインフルエンザでも同様の例はあったと考えます。しかし空気感染（Air-borne）というのは魅惑的な響きがあるらしく、あえて煽りを狙ったのだとは思いますが7月になって「SARS-CoV-2の空気感染：世界は目を背けるな」と題した論文が発表され<sup>11)</sup>、話題になりました。読んでみると3月頃報道されていた、中国におけるレストランのエアコン流による伝播など、やや例外的と思える事象をことさらに扱っている印象があり、結局空調や設備の対処の重要性を説いている論文です。239名もの科学者が賛同して署名したというのが売りですが、実はその科学者の大半が感染症関連ではなく、工学・建築・環境・空調を専門としているということはご存じでしたか。つまり今後の世界的な環境整備への投資を期待しているフシがあり、様々な思惑が込められているように思います。

## 8. おわりに

全世界の生活を一変させたといつても良い新型コロナウイルス禍。そんな中で無知や誤解によってミスリードされていると思われる話題を主に扱って、なるべくフェアな視点から解説してみました。こうした事象を眺めて印象深いのは、これほどまでの悲劇的な状況でも、いや、だからこそかも知れませんが、この機会に名を上げたり、予算を引き出したり、投資を呼び込んだりしようとする多くの人の企てが蠢（うごめ）いていたことです。見栄えなどかなぐり捨てての、こうした呆れるほどのバイ

タリティを見ていると、人類が滅びることはない妙な安心感を覚えます。しかしそれが良い結果になるかどうかはまた、別の話のようにも思えます。

良き明日を作るために、各々矜持を持って精一杯進んでいきたいです。

## References

- 1) Masters, P. S. & Perlman, S.: Coronaviridae. in Fields Virology (eds D. M. Knipe & P. Howley) (Wolters Kluwer, 2013).
- 2) Taguchi, F.: [SARS coronavirus]. Uirusu 53, 201-209, doi:10.2222/jsv.53.201 (2003).
- 3) Taguchi, F.: [Coronaviruses]. Uirusu 61, 205-210, doi:10.2222/jsv.61.205 (2011).
- 4) Minskaia, E., Hertzig, T., Gorbatenko, A. E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B. et al.: Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 5108-5113, doi:10.1073/pnas.0508200103 (2006).
- 5) Taguchi, F.: [Cell entry mechanism of coronaviruses: implication in their pathogenesis]. Uirusu 56, 165-171, doi:10.2222/jsv.56.165 (2006).
- 6) Zhang, Y. Z. & Holmes, E. C.: A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. Cell 181, 223-227, doi:10.1016/j.cell.2020.03.035 (2020).
- 7) Zhang, T., Wu, Q. & Zhang, Z.: Probable Pangolin Origin of SARS-CoV-2 Associated with the COVID-19 Outbreak. Curr Biol 30, 1346-1351 e1342, doi:10.1016/j.cub.2020.03.022 (2020).
- 8) Tang, X., Wu, C., Li, X., Song, Y., Yao, X., Wu, X. et al.: On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2. National Science Review 7, 1012-1023, doi:doi.org/10.1093/nsr/nwaa036 (2020).
- 9) Forster, P., Forster, L., Renfrew, C. & Forster, M.: Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes. Proc Natl Acad Sci U S A 117, 9241-9243, doi:10.1073/pnas.2004999117 (2020).
- 10) Escobar, L. E., Molina-Cruz, A. & Barillas-Mury, C.: BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). Proc Natl Acad Sci U S A, doi:10.1073/pnas.2008410117

- (2020).
- 11) Morawska, L. & Cao, J.: Airborne transmission  
of SARS-CoV-2: The world should face the  
reality. Environ Int 139, 105730,  
doi:10.1016/j.envint.2020.105730 (2020).

## 他誌掲載論文抄録

(令和元年4月～令和2年3月)

### ニューキノロン耐性肺炎マイコプラズマ実験由来株について

大屋日登美, 古川一郎(神奈川県衛研), 大石智洋(川崎医科大学), 堀野敦子(国立感染症研究所), 小田洋一郎(茅ヶ崎市立病院), 見理剛(国立感染症研究所), 成田光生(札幌徳洲会病院), 黒木俊郎(神奈川県衛研, 現岡山理科大学) 日本マイコプラズマ学会雑誌, 46, 89-92 (2019)

2000年以降, マイコプラズマ肺炎の第一選択薬剤であるマクロライド系薬剤(MLs)に耐性を示す肺炎マイコプラズマ(MRMP)の増加が問題となっている。成人領域では, MRMPの出現によりフルオロキノロン系薬剤(FQs)が治療に多用されるようになったため, FQs耐性肺炎マイコプラズマ(FRMP)の出現が懸念される。

マイコプラズマ肺炎は家族内感染が多く, 成人でFRMPが出現した場合, 小児へ拡散する可能性があり, さらに, 小児では副作用の点から薬剤使用が限られているため治療の問題となる。現在のところFRMPの臨床分離株は確認されておらず, 実験由来株も国内では報告がない。そこで, 最近の神奈川県内臨床分離株におけるMLsとFQsに対する薬剤感受性試験を実施し, 薬剤耐性菌の出現状況を調べるとともに, 県内臨床分離株を用いたFRMPのセレクション実験にて出現の可能性を調べた。その結果, 県内臨床分離菌株については, MRMPは減少傾向にあり, FRMPは検出されなかった。一方, 実験的に作製したFRMPを用いて, FQ耐性に関与するDNAジャイレスとトポイソメラーゼIV領域のgyrA, gyrB, parC遺伝子の塩基配列を解析したところ, アミノ酸配列の変異を伴う点変異が認められた。

### 流行性筋痛症とヒトパレコウイルス

石田倫也, 白井宏幸(相模台病院), 白井宏直, 土岐平, 野々田豊, 岩崎俊之, 石倉健司(北里大学医学部), 野々山勝人(のんのキッズクリニック), 佐野貴子(神奈川衛研), 小児科, 60, 1395-1400 (2019)

ヒトパレコウイルス3型(HPeV3)は, 新生児や早期乳児のsepsis-like syndromeにかかるウイルスとして注目されている。今回われわれは, 同時期同地域に多発した流行性筋痛症の学童例を経験した。咽頭・便検

体にてウイルス分離・同定検査を行い, そのすべてからHPeV3型が検出されたことから, 原因ウイルスと考えられた。症例は6歳から12歳の学童4名で, 隣接する学区の2つの小学校に通学する学童男子3名, 女子1名であった。全症例とも同時期に発熱と咽頭痛を呈し, 感冒と診断され, 対症療法で軽快した。3例は発熱直後から近位筋優位に筋痛を呈し, その後増悪傾向が認められた。1例は解熱後3日経過して筋痛が顕在化した。1例は全身筋肉痛のため歩行困難を呈し入院安静加療を要したが, 3例は外来で安静指示を行い筋痛は軽快した。年長児や成人ではこれまでにもHPeV3に起因すると考えられる流行性筋痛症の報告があるが, 学童齢期のHPeV3感染の報告はまれであり, 今後も症例情報の集積が必要である。

### Hepatitis A virus infection in an HIV-positive man with previously confirmed immunity against hepatitis A virus Comparative.

吉村幸浩, 堀内弘司, 宮田順之(横浜市立市民病院), 近藤真規子(神奈川衛研), 立川夏夫(横浜市立市民病院) Clinical Journal of Gastroenterology, doi 10.1007/s12328-020-01102-x

9年前, A型肝炎ウイルス(HAV)感染歴, あるいはワクチン歴のない, HIV陽性日本人男性から抗HAV抗体, IgGが検出された。9年間の抗HIV薬治療により血中HIV・RNA量は6年以上検出限界以下でコントロールされていた。本症例はその後, A型肝炎を発症したが, 抗HAV IgG力価は低下していた。HIV感染者の抗HAV IgGの低下は, HAV再感染の可能性を示しており, 追加のワクチン接種の検討を促す必要があると考えられる。

### 室内空気を介した飲料水への揮発性有機化合物の汚染について

佐藤学, 西以和貴, 上村仁(神奈川衛研), 食品衛生研究, 通巻830号(69巻, 5号), p.91-95, (2019)

健康志向や飲料水の安全への関心が強まる中で、ペットボトル入りの飲料水の需要が高まっている。ペットボトル入りの飲料水の水源はVOCによる汚染が極めて少なく、採水から密栓までが採水地で行われるため、開栓

するまで汚染を受けにくいと考えられていたが、未開封のペットボトルにおける室内空気環境からのVOC汚染が原因と思われる異臭苦情などが複数報告されている。これらの室内空気からの未開封ペットボトルへのVOC汚染について、防虫剤等に使用されるp-ジクロロベンゼンを用いた曝露実験を行ったところ、一般家庭にみられる保存環境においても長期間の曝露によってVOCが未開封のペットボトル内に移行することが明らかになった。また、未開封ペットボトルにパラフィンを用いてシーリングを行い、汚染経路は主としてキャップ部分からであることを確認した。

#### 液体クロマトグラフィータンデム質量分析による水道水中の140農薬の一斉分析法の妥当性評価

小林憲弘（国衛研）、宮本紫織（愛媛県）、佐藤学（神奈川衛研）、木下輝昭（東京都健康安全研究センター）、高木総吉（大阪健康安全基盤研究所）、岩間紀知（岐阜県公衆衛生検査センター）、粕谷智浩（千葉県薬剤師会検査センター）、古川浩司（三重県環境保全事業団）、堀池秀樹（島津製作所）、齊藤香織（サーモフィッ

シャーサイエンティフィック）、京野完（アジレント・テクノロジー）、高原玲華（ジーエルサイエンス）、五十嵐良明（国衛研）、水環境学会誌，Vol.42，No.6，pp.247-258，(2019)

水道水中の140農薬のLC/MS/MS一斉分析法が全国の水道水質検査に適用できるかどうかを検証するために、国立衛研以外に新たに11機関において水道水を用いた添加回収試験を行い、これら12機関の試験結果を合わせて解析および評価した。各機関は、採取した水道水にアスコルビン酸ナトリウムを加えて脱塩素処理した後、140農薬の混合標準液を添加し、各機関で最適化したLC/MS/MS測定条件を用いて試料を測定した。その結果、48農薬は目標値の1/10と1/100の両方の添加濃度において全12機関が厚生労働省の「水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン」の真度・併行精度の両方の目標を満たし、69農薬は過半数（ $\geq 7$ ）の機関が同ガイドラインの真度・併行精度の両方の目標を満たしたことから、本分析法は迅速・簡便な農薬一斉分析法として全国の水道水質検査に適用できると考えられる。

Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health (Bull. Kanagawa Ins. of P.H.) is an official periodical on research works at Kanagawa Prefectural Institute of Public Health and is published, as a rule, annually. All communications relating to the publication should be addressed to the Editorial Board.

**Editorial Board**  
**KANAGAWA PREFECTURAL INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH**  
**1 - 3 - 1 Shimomachiya, Chigasaki 253-0087**  
**JAPAN**

# Bulletin of Kanagawa Prefectural Institute of Public Health No.50 (October, 2020)

---

## CONTENTS

### Short reports

#### **Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease**

Isolation of diarrheal pathogen from patients with diarrhea and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli*

Tomoka MASAOKA, Ichiro FURUKAWA, Yoshimi DATE, Michio JINNAI,  
Yuriko HARIMA, Miyuki SUZUKI, Naoki NAKAJIMA and Hitomi OHYA ..... 1

#### **Surveillance study to assure safety of food products and medicine**

Fast method for detection of pesticides in foods related to health crisis management using GC-MS/MS and LC-MS/MS

Toru FUKUMITSU, Masumi WAKI, Masahito HAGIO, Takako HAYASHI  
and Chikako KUWAHARA ..... 5

Stability of pH standard solutions under various storage conditions

Fumiaki SOTODATE, Shigemi KAI, Takayuki IWAHASHI, Chikako HADA  
and Kenichi KUMASAKA ..... 11

Analytical method for mothproofing agents in textile products under conditions of insufficient helium gas supply

Iwaki NISHI, Hitoshi UEMURA and Tsuyoshi KAWAKAMI ..... 15

### Data

#### **Surveillance study on monitoring and prevention of infectious disease**

Occurrence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Kanagawa Prefecture (April, 2019-March, 2020)  
Ichiro FURUKAWA, Tomoka MASAOKA, Naoki NAKAJIMA ..... 21

Surveillance of influenza virus in Kanagawa Prefecture (2019/2020 season)

Sumi WATANABE, Makiko KONDO, Takako SANO, Takatsugu INADA  
and Junichi SAKURAGI ..... 25

#### **Surveillance study to assure safety of food products and medicine**

Verification study of analytical method for sulfur dioxide and sulfites in foods

Yasuhiro SAKAI, Miyuki NISHI, Yurika AWANO, Motohiro UEHARA,  
Kumiko SATO, Masumi WAKI, Katsuhiro AIKAWA ..... 28

### Contribution

Knowledge of novel coronavirus from current topics  
Junichi SAKURAGI ..... 31

---

Abstracts of original papers by research staffs (April, 2019 - March, 2020) ..... 37

---